

Aus dem Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof.

CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER MEIOSE UND POLLENENTWICKLUNG WEIBLICHER REBENSORTEN*.

Von

ERNST WAGNER.

Mit 17 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Juli/18. August 1951.)

A. Einleitung.

Im Gegensatz zu den echten weiblichen Angiospermenblüten, bei denen überhaupt keine Antheren ausgebildet werden, sind bei den physiologisch weiblichen Sorten der Gattung *Vitis* die Staubbeutel voll entwickelt, so daß sie wie bei pollenfertilen Blüten zum Stäuben kommen. In morphologischer Hinsicht sind im charakteristischen Falle die verkürzten Filamente stark nach außen gekrümmt, eventuell auch spiralgig gedreht. Es gibt aber auch alle Übergänge bis zu solchen Blüten, die in der Antherenlänge und -stellung den Zwitterblüten gleichen, dabei aber physiologisch rein weiblich sind. Andererseits erwähnt DORSEY (1915), daß er unter 37 amerikanischen Sorten mit abgebogenen Filamenten zwei teilweise pollenfertile gefunden habe, die offenbar als Zwitter mit abnorm gestellten Antheren angesehen werden müssen. Ebenso ist die Sachlage wohl auch bei den von KRAUSE (1912) beschriebenen 3 kaukasischen *vinifera*-Sorten. Leider liegen in beiden Fällen keine Angaben über etwaige Pollenuntersuchungen vor; denn nach dem Pollenbild ist eine einwandfreie Entscheidung immer ohne Schwierigkeiten möglich: reifer Pollen aus physiologisch weiblichen *Vitis*-Blüten ist stets eingedellt und besitzt niemals Keimfurchen oder Keimporen (LEVADOUX 1946, DE LATTIN 1950).

Bei amerikanischen Rebensorten, besonders bei *Vitis vulpina* (= *riparia*) hat DORSEY (1914) gefunden, daß die Pollenmeiose normal verlief und daß Störungen erst nach der Teilung des primären Pollenkerns auftraten. Von den bei dieser Teilung entstehenden Kernen degenerierte zuerst der generative. IVANOVA-PAROISKAJA (1929/1930) bestätigte diesen Befund an mittelasiatischen Rebensorten und zeigte ferner, daß der primäre Pollenkern auch bereits vor der Teilung degenerieren kann.

In neuerer Zeit findet eine Tatsache immer mehr Beachtung, auf die BARANOV und RAJKOVA (1929/1930) für männliche Sorten hinwiesen,

* Mit Unterstützung des Landwirtschaftlichen Forschungsrates e. V. — Herrn Professor Dr. HUSFELD und Herrn Dozenten Dr. DE LATTIN danke ich dafür, daß sie mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit ermöglicht und stets lebhaftes Interesse an ihrem Fortgang genommen haben.

daß nämlich bei allen pollenfertilen Sorten ein gewisser Prozentsatz deformierten Pollens auftritt (BREIDER 1940, DE LATTIN 1950, GOLL-MICK 1950). Deformierter Pollen ist steril. Einen Extremfall in dieser Hinsicht stellen die sog. weiblichen Rebensorten dar. Über ihre 100%ige Sterilität haben die Keim- und Befruchtungsversuche KACZMAREKS (1938) entscheidende Ergebnisse gebracht. Die Herabsetzung der Pollenfertilität kann u. a. durch chromosomale Störungen während der Meiose bedingt sein. Wenn solche Störungen im Zusammenhang mit der Sterilität überhaupt auftreten, dann müssen sie am ehesten bei weiblichen Sorten feststellbar sein. Zur Klärung dieser Frage wurden die nachstehenden Untersuchungen durchgeführt.

B. Material und Methoden.

Für die Bearbeitung wurden die folgenden weiblichen Rebensorten¹ ausgewählt.

Europäische Rebensorten: *Vitis silvestris* GMELIN; *Vitis vinifera* L., Sorte *Madeleine angevine*.

Amerikanische Rebensorten: *Kober 5 BB* (Bastard aus *Vitis Berlandieri* PLANCH. \times *Vitis riparia* MICHX.), *Vitis riparia* MICHX., Sorte *Riparia pubescens bleu*.

Als Kreuzung zwischen amerikanischen und europäischen Sorten: Ein Stock aus einer F_2 -Aufspaltung der Sorte *Oberlin 595* (F_1 aus *Vitis riparia* MICHX. \times *Vitis vinifera* L., Sorte *Gamay noir*).

Zum Vergleich wurde als pollenfertile Sorte ein Zwitter, und zwar ein Riesling-Klon herangezogen.

Mittelasiatische Sorten standen noch nicht zur Verfügung.

Zur Feststellung des Entwicklungszustandes der Blütenknospen wurde, ebenso wie zur späteren genauen Untersuchung, die in geeigneterweise abgeänderte Karmin-Essigsäuremethode angewandt. Als Fixierungsflüssigkeit diente Alkohol-Eisessig (2:1). Unmittelbar nach dem Fixieren angefertigte Präparate lassen spätestens nach einer halben Stunde immerhin erkennen, ob der Staubbeutel mehr oder weniger festes sporogenes Gewebe, freie Pollenmutterzellen, Tetraden oder Pollenkörner bestimmter Altersstufen enthalten hat. Um gute Bilder besonders auch der Ruhekerne und der prophasischen Stadien zu erzielen, müssen die fixierten Objekte mindestens 14 Tage in der Fixierungsflüssigkeit verbleiben. Von wesentlicher Bedeutung ist es, bei der Auswahl zum Fixieren nicht vom ganzen Blütenstand auszugehen, sondern von seinen einzelnen Verzweigungen, da das Material sonst unverhältnismäßig wenige der gesuchten Stadien enthält.

Ein besonderer Vorteil der Karmin-Essigsäuremethode mit feuchten Präparaten ist es, daß man während der Beobachtung je nach Bedarf differenzieren und wieder nachfärben und so immer den günstigsten Färbungszustand herstellen kann. Ein weiteres günstiges Moment besteht in der Beobachtung ganzer Pollenmutterzellen, die bei *Vitis* einen Durchmesser von etwa 20μ haben.

Der Entwicklungszustand der Antheren ist weitgehend proportional zur Größe der Blütenknospen, ausgedrückt durch ihren Durchmesser. Allerdings ist dies Verhältnis von Sorte zu Sorte verschieden, selbst von Stock zu Stock treten Schwankungen auf. Bei einem alten Gutedelstock, einer zwittrigen *vinifera*-Sorte,

¹ Unter Sorte versteht man im Weinbau die vegetative Nachkommenschaft eines Stockes, also einen Klon, oder auch, besonders in der Praxis, eine Population sehr ähnlicher Klone.

enthielten Knospen von einer Verzweigung eines Blütenstandes bei einem Durchmesser von: 0,71 mm festes sporogenes Gewebe; 1,28 mm lockeres sporogenes Gewebe; 1,49 mm freie Pollenmutterzellen, Kerne in Prophase zur 1. meiotischen Teilung; 1,92 mm Pollentetraden.

Bei den untersuchten weiblichen *vinifera*-Sorten hatten die Knospen bei Beginn der Meiose einen Durchmesser von etwa 1,5 mm, bei der weiblichen *Kober 5 BB* betrug er etwa 1,0 mm. Bis zum Freiwerden der Pollenzellen aus der Tetrade waren die Knospen so weit herangewachsen, daß ihr Durchmesser um 25–30% größer war; bei *vinifera*-Weibchen betrug er 1,8–2,0 mm, bei *Kober 5 BB* etwa 1,3 mm.

Dem Anblick nach kann man schon ungefähr sagen, ob in einem Blütenstand Meiosen in den Antheren zu erwarten sind. Die Knospen noch vollständig geschlossener Blütenstände enthalten nur sporogenes Gewebe. Wenn die basalen Verzweigungen gerade anfangen sich abzuspreizen, findet man in den Antheren der größten Knospen Pollenmutterzellen, die mit der 1. meiotischen Teilung beginnen.

Die relative Länge der Kelchblätter bietet ebenfalls einen Anhaltspunkt zur Beurteilung des Zustandes der Antherenentwicklung: bei Beginn der Pollenmeiose bedecken sie die Knospe noch etwa bis zur Hälfte.

Alle in den folgenden Ausführungen berücksichtigten anomalen Stadien lagen in unmittelbarer Nähe völlig normaler Zellen. Die zunächst naheliegende Vermutung, daß es sich in manchen Fällen um Artefakte als Folge mißlungener Fixierungen handeln könnte, ist damit ausgeschaltet.

C. Ergebnisse.

1. *Vitis silvestris* GMELIN.

Schon bei der 1. meiotischen Teilung treten Störungen bei der Verteilung der Chromosomen auf. Vielfach bestehen sie darin, daß eines oder auch einige der Chromosomen die Anaphasebewegung nicht mitmachen und im Äquator liegen bleiben oder aber vorausseilen. Im letzteren Falle kann ein solches Chromosom im Polraum liegen bleiben oder völlig aus dem Spindelbereich herausrücken. Abb. 1 stellt eine solche Anaphase I dar. Ein Chromosom ist vorausgeeilt und liegt am Spindelpol. Die beiden Platten stehen nicht parallel zueinander, sondern bilden einen Winkel. Das besonders auffällige an dieser Pollenmutterzelle ist aber, daß ein Chromosom weitab vom Spindelraum liegt. Eine stark hervortretende Spindelfaser zieht von ihm aus an der Spindel vorbei und endet blind im Plasma. Der übrige Spindelteil ist schwach ausgebildet im Vergleich zu anderen Pollenmutterzellen desselben Präparates. Abb. 2 zeigt eine beginnende Anaphase mit einem zum Pol vorausgeeilten Chromosom und einer Gruppe von Chromosomen außerhalb des Spindelbereiches. Die Spindel ist nach einem Pol zu deutlich zu erkennen, während sie auf der anderen Seite, wo die Chromosomengruppe liegt, nur undeutlich hervortritt.

Während der 1. meiotischen Teilung kann es schon zu einer pyknotischen Degeneration kommen. In der Pollenmutterzelle der Abb. 3 sind die Chromosomen zu wenigen Ballen verklumpt. Von einer Spindel oder

auch nur Spindelresten ist nichts zu bemerken. Gelegentlich liegen derartige Zellen in Nestern von 10 und mehr zwischen normal aussehenden, weiter entwickelten Pollenmutterzellen. Das Farbaufnahmevermögen degenerierender Chromosomen ändert sich; die erwähnten Ballen färben sich rostrot, während normale Chromosomen eine tiefe Schwarzfärbung zeigen. Im Plasma treten gleichzeitig Umbildungen auf; es wird erst grobkörniger und nimmt schließlich einen einheitlichen Farbton an, ein

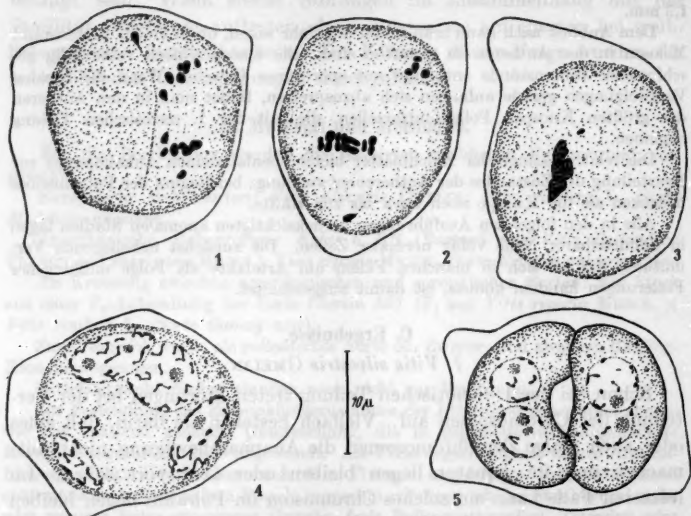


Abb. 1—5. *Vitis silvestris*. 1—4 Pollenmutterzellen. 1 Anaphase I mit Einzelchromosom. 2 Metaphase I mit Einzelchromosom und isolierter Chromosomengruppe. 3 Metaphase I. Verklumpte Chromosomen. 4 4-Kern-Stadium mit Kleinkern. 5 Dyade. Zweikernige Doppelpollen.

abweichendes, fahles Rot. Es setzen Schrumpfungen des Plasmas ein, und von einem Kern ist bald nichts mehr zu bemerken.

Bei der 2. meiotischen Teilung findet man ganz entsprechende Abnormitäten wie bei der 1. meiotischen Teilung. Es treten wieder eliminierte Einzelchromosomen auf, auch zwei getrennt liegende kommen vor, und Kleinkerne konnten beobachtet werden. Verschiedentlich fanden sich sehr schwer nachzuweisende Chromatingebilde, die derart klein waren, daß ich sie für Bruchstücke von Chromosomen halten möchte. Wenn ein Kleinkern nach der 2. meiotischen Teilung gefunden wird, dann ist oftmals nicht zu sagen, ob er aus der 1. oder aus der 2. meiotischen Teilung stammt. Abb. 4 gibt ein Beispiel einer Pollenmutterzelle, bei der man mit einiger Sicherheit eine Entscheidung treffen kann. Nach

der Abbildung hat man den Eindruck, daß der Kleinkern zwischen den Kernen rechts oben und links unten liegt. Messungen der Höhenlage der 5 Kerne zeigen, daß er auch räumlich und nicht nur in der Projektion auf die Zeichenebene dazwischen liegt. Die räumliche Lage zusammen mit den Größenverhältnissen läßt es als sicher erscheinen, daß der Kleinkern in der 2. meiotischen Teilung aus zurückgebliebenen Chromosomen der beiden Kerne entstanden ist, zwischen denen er liegt. Der Chromosomenzustand aller 5 Kerne ist derselbe. Nur fehlen dem Kleinkern und dem benachbarten Kern, der den Hauptteil der Kleinkernchromosomen geliefert haben dürfte, die Nucleolen. Vielleicht werden sie noch verspätet gebildet; die Nucleolenkondensation könnte aber auch gestört sein. In den anderen Kernen sind 1 bzw. 2 Nucleolen vorhanden. Auf Schwankungen in der Zahl der Nucleolen hat bereits DORSEY (1914) hingewiesen.

Bei der Tetradenbildung treten Störungen der simultanen Wandbildung auf, so daß statt wie normal 4 nur 2 Pollen entstehen können. Abb. 5 stellt eine solche Dyade dar, bei der jede Pollenzelle 2 Kerne besitzt. Häufig zeigen solche Doppelpollen eine mehr oder weniger tiefe Einbuchtung. Oft ist ein Doppelpollen zusammen mit zwei normal großen vorhanden. In einem Präparat fanden sich unter etwa 150 Tetraden 15 solcher Triaden. Es treten auch einkernige Doppelpollen auf. Bei diesen hat man den Eindruck, daß ihr Kern doppelt so groß ist wie der eines normalen Pollens. Um zu einer begründeteren Aussage zu gelangen, wurden solche Großkerne gemessen und im Vergleich dazu Kerne von normalgroßen Pollenzellen desselben Präparates, also aus derselben Anthere. Wenn man die Kerne in erster Annäherung als Ellipsoide mit 3 verschieden langen Achsen betrachten darf, dann sind die danach berechneten Volumina der Großkerne um ungefähr 75% größer als die der normalen Kerne. Natürlich ist das nur ein angenäherter Wert; einmal ist die Zahl der in einem Präparat möglichen Messungen zu gering, und dann sind die Kerne ja auch keine genauen Ellipsoide. In den jungen Tetraden findet man zunächst noch ganz normal aussehende Pollen. Dann aber setzen sehr bald Degenerationsvorgänge ein. Alle aus den Tetraden freiwerdenden Pollenzellen sind bereits eingedellt. Besonders deutlich ist das zu sehen, wenn mit Filtrierpapier ein Flüssigkeitsstrom durch das Präparat gesaugt wird und die Pollenkörner so ins Rollen kommen. Dabei zeigt sich, daß auch die zunächst normal erscheinenden Pollenkörner sämtlich eingedellt sind. Die Degenerationserscheinungen schreiten offenbar sehr schnell fort. In einer Knospe z. B. besaß eine Anthere nur Pollenmutterzellen im 4-Kern-Stadium, die anderen enthielten nebeneinander in Bildung begriffene und fertige Tetraden. Während die Bildungsstadien noch ohne jede Störung waren, zeigten manche der fertig ausgebildeten Tetraden, offen-

sichtlich die ältesten, an einzelnen Pollen bereits kleine Eindellungen. Bei Beginn dieser Eindellungen erscheinen die Kerne der Pollen als ganz normale Ruhekerne. Bei eingedellten Pollenzellen wird der Kern schlechter färbbar und ist bald nicht mehr nachzuweisen. Zusammenballungen, wie bei degenerierenden Metaphasechromosomen, treten nicht auf. Mit dem Verschwinden des Kernes geht auch die Plasmagranulation, die erst gröber wird, völlig verloren. Sie verschwindet zuerst in der Nähe des Kernraumes, während die Randpartien am längsten Granula aufweisen.

Bei *Vitis silvestris* GMELIN erfolgt also der auffälligste und entscheidende Degenerationsschritt nach vollzogener Tetradenbildung.

2. *Vitis vinifera* L., Sorte *Madeleine angevine*.

Es treten ganz entsprechende Störungen der meiotischen Teilungen auf wie bei *Vitis silvestris*, wenn sie auch weniger häufig waren. Eine bemerkenswerte Beobachtung konnte an den Interphasekernen gemacht werden. Abb. 6 stellt ein derartiges 2-Kern-Stadium dar. Neben einem abgeirrten Chromosom zeigt es vor allem einen auffälligen Größenunterschied der beiden Kerne. Dem Volumen nach ist der obere etwa 3mal so groß wie der untere. Wenn man die Kerngröße und die Anzahl der in ihm enthaltenen Chromosomen proportional setzen darf, dann würde der eine Kern etwa 28, der andere nur 9 Chromosomen enthalten. Es traten noch extremere Größenverhältnisse auf, bei denen sich die Kernvolumina sogar wie 6:1 verhielten und damit die Anzahl der Chromosomen je Kern etwa 32 und 6 betragen würde. Abb. 7 zeigt eine späte Telophase II mit einem abgeirrten Chromosom. Es bilden sich gerade die Ruhekerne heraus, die Kernmembran ist erst undeutlich, ein Nucleolus überhaupt noch nicht zu sehen. Das Einzelchromosom steht anscheinend im selben Stadium des Formwechsels wie die Chromosomen in den Kernen. Ob es bei der 2. meiotischen Teilung aus dem Spindelraum herausgeraten ist oder von der 1. meiotischen Teilung her stammt, ist nicht zu entscheiden. Bei *Madeleine angevine* konnte überhaupt kein einwandfreier Fall der Chromosomenausstoßung in der 2. meiotischen Teilung gefunden werden. Man gewinnt den Eindruck, daß bei dieser Sorte die homöotypische 2. meiotische Teilung zum mindesten weniger anfällig ist. Während der Meiose kommt es nicht zum Absterben von Pollenmutterzellen. Daß aber Einflüsse vorhanden sind, die die Entwicklung verzögern, muß man aus solchen Beobachtungen schließen wie der, daß in einer Anthere mit Anaphasen II sich eine Anzahl ganz normal aussehender Metaphasen I fand. Abb. 8 läßt in einer Pollenmutterzelle nach der 2. meiotischen Teilung neben den 4 Kernen einen wohlausgebildeten Kleinkern mit Nucleolus erkennen. Dieser Kleinkern ist nur an seiner Größe und Lage in der Zelle von den anderen Kernen zu unterscheiden.

Es sind danach Fälle denkbar, in denen nicht zu erkennen ist, welcher von 5 Kernen der überzählige ist.

Bei der Herausbildung der Tetraden, also während der simultanen Zellwandbildung, setzen Störungen ein, die oft einen beträchtlichen Prozentsatz der Pollenmutterzellen betreffen; in einem Falle waren 30 %

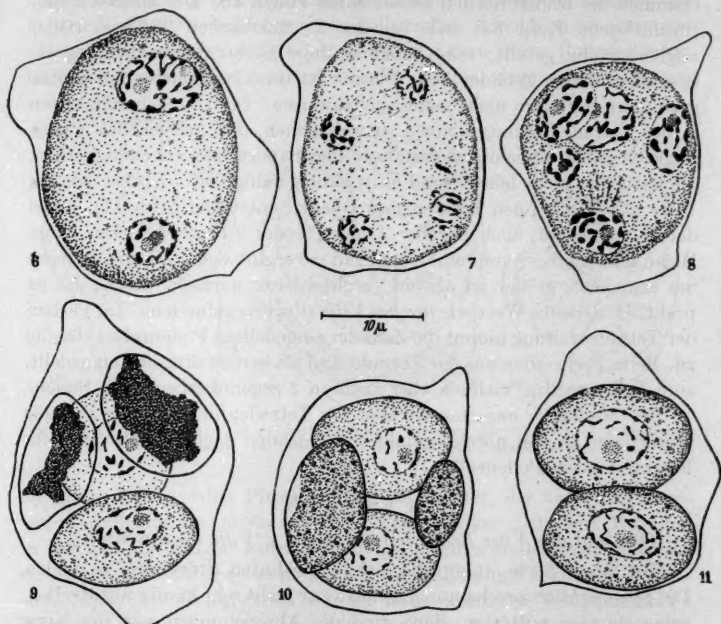


Abb. 6—11. *Vitis vinifera*, Sorte *Madeleine angevine*. 6—8 Pollenmutterzellen. 6 2-Kern-Stadium mit verschieden großen Kernen und Einzelchromosom. 7 4-Kern-Stadium mit Einzelchromosom. 8 4-Kern-Stadium mit Kleinkern. 9 Tetrade mit 2 normalen und 2 abgestorbenen Pollenzellen. 10 Tetrade mit 2 normalen und 2 verschieden großen, degenerierenden Pollenzellen. 11 Tetrade mit 2 einkernigen Doppelpollen.

der Pollenmutterzellen eines Präparates geschädigt. In den normal gebildeten Tetraden gehen Schrumpfungen und Eindrückungen sehr schnell vor sich. Die Schrumpfungen, die hauptsächlich zu Beginn der Tetradenreife auftreten, erreichen ein stärkeres Maß als bei *Vitis silvestris*. Bei *Madeleine angevine* führen sie mitunter zum vollständigen Absterben aller 4 Pollenzellen einer Tetrade. Vielfach findet man Bilder wie Abb. 9, wo 2 der Entstehung nach zusammengehörige Pollen degeneriert sind. Ihr Plasma ist vollständig abgestorben, von Kernen keine Spur mehr zu sehen. Es finden sich auch Tetraden, bei denen gegenüberliegende

Pollenfächer nur noch ganz geringe Pollenreste enthalten. Abb. 10 zeigt in einer Tetrade 2 normale und 2 verschieden große, degenerierende Pollenzellen. Diese Verhältnisse können folgendermaßen erklärt werden: bei der 1. meiotischen Teilung hat eine ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen stattgefunden. Von dem dabei gebildeten größeren Kern stammen die beiden normal aussehenden Pollen ab. Der andere, hypochromatische Kern hat sich bei der 2. meiotischen Teilung wieder ungleichmäßig geteilt; seine Abkömmlinge haben die beiden degenerierenden Pollen gebildet. Ihr Plasma ist dunkler gefärbt und gröber granuliert, ein Kern nicht mehr nachzuweisen. Die Unregelmäßigkeiten in der Tetradenbildung können so weit gehen, daß gelegentlich 4 ganz ungleich große, verschieden gestaltete Plasmaportionen abgeteilt werden, die natürlich nicht lebens- und entwicklungsfähig sind. Ebenso wie bei *Vitis silvestris* können Triaden und Dyaden entstehen (Abb. 11), wobei der Doppelpollen, auch der der Triade, 1 oder 2 Kerne besitzen kann. Wenn man die Kernvolumina vergleicht, so ergibt sich, daß ein Großkern um etwa 80% größer ist als ein vergleichbarer normaler Kern; das ist praktisch derselbe Wert wie der bei *Vitis silvestris* gefundene. Im Verlauf der Tetradenreifung nimmt die Zahl der eingedellten Pollenzellen ständig zu. Beim Freiwerden aus der Tetrade sind sie bereits sämtlich eingedellt, zum Teil einseitig, vielfach aber auch an 2 gegenüberliegenden Stellen.

Bei *Madeleine angevine* ist also die Tetradenbildung sehr auffällig gestört und in den normal gebildeten Tetraden degenerieren sämtliche heranreifenden Pollenzellen.

3. Kober 5 BB.

(Bastard aus *Vitis Berlandieri* PLANCH. \times *Vitis riparia* MICHX.)

Bei dieser Sorte waren alle bisher erwähnten Störungen zu finden. Die Degenerationerscheinungen sind zwar nicht sehr häufig anzutreffen; wenn sie aber auftreten, dann sind die Abweichungen von der Norm meist sehr extrem ausgebildet. Einige Besonderheiten sind erwähnenswert. So traten in Antheren, die späte Stadien der 1. meiotischen Teilung enthielten, Pollenmutterzellen mit einem abnorm großen Kern auf. Abb. 12 zeigt eine andere Pollenmutterzelle, die inmitten von normalen Stadien der 1. meiotischen Teilung lag; einige Chromosomen haben einen kleinen Kern gebildet, die anderen liegen weit verstreut im Plasma. Gelegentlich ist die Chromosomenauflockerung in den Tochterkernen bzw. -platten verschieden weit fortgeschritten. So lag z. B. an einem Pol eine Telophase, am anderen ein weitgehend rekonstruierter Kern. In einem anderen Falle war der eine Tochterkern bereits als Ruhekern ausgebildet, die Chromosomen des anderen dagegen machten nach Form und Farbe einen degenerierten Eindruck. Bei abgestorbenen Pollenmutterzellen schienen die Membranen verquollen zu sein.

Besonders extreme, doch nicht sehr zahlreiche Störungen traten bei der Tetradenbildung auf. Sehr auffällig ist es, daß ein Teil des Plasmas von der Aufteilung zur Tetrade ausgeschlossen bleiben kann. Selbst bei der Bildung der normalen Zahl von 4 Pollenzellen kann ein restlicher Plasmateil übrigbleiben, der dann degeneriert (Abb. 13). Es fanden sich auch Tetraden mit 3 Pollenzellen und einem Plasmarest. Andere enthielten 2—4 ganz verschieden große Pollenzellen, deren Kernabmessungen entsprechend schwankten; oder es waren neben einer Pollenzelle unförmige Plasmaportionen mit mehr oder weniger degenerierten Kernen

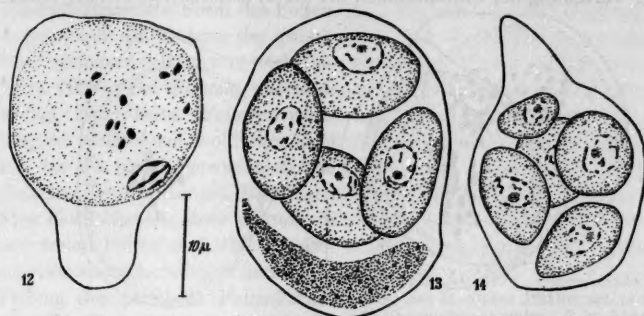


Abb. 12—14. *Kober 5 BB*. 12 Pollenmutterzelle. Versagen der Spindel. 13 Tetrade mit Restplasma. 14 Tetrade mit überzähligen Pollenkorn.

zu finden. Es wurden Plasmagebilde beobachtet, die derart monströs waren, daß man sie, allein für sich betrachtet, gar nicht mit Tetraden in Verbindung bringen würde. Nicht ganz selten findet man Tetraden mit einer überzähligen, wohlentwickelten, allerdings kleineren Pollenzelle (Abb. 14). Gelegentlich wurden unter normalen Tetraden Zellen gefunden, die zwar die äußere Größe der Tetrade und deren Membranverdickungen zeigten, aber in einem einheitlichen, relativ kleinen Plasmaleib nur einen großen Kern enthielten. Aus der großen Masse der normalen Tetraden werden Pollen frei, die nur zu einem sehr geringen Teil Eindellungen aufweisen.

Die entscheidenden Degenerationerscheinungen treten bei der Sorte *Kober 5 BB* erst an den jungen, aus der Tetrade freigewordenen Pollenkörnern ein, wobei es noch offen bleibt, ob und inwieweit dieser Vorgang vor oder nach der Teilung des primären Pollenkerns erfolgt.

4. *Vitis riparia* MICHX., Sorte *Riparia pubescens* bleu.

Auch bei dieser amerikanischen Sorte treten die verschiedenen bereits beschriebenen Störungen wie bei *Kober 5 BB* auf. Eine besonders

auffällig gestörte Teilungsfigur stellt Abb. 15 dar. Während in der linken Hälfte dieser 1. meiotischen Teilung die Chromosomen über den ganzen Raum zwischen den Polen unregelmäßig verstreut liegen, sind sie rechts noch dicht zusammengelagert und in 2 Fällen durch Brücken verbunden. Außer solchen typischen Brückenbildungen, wie sie DE LATTIN (1950) bereits bei einer anderen *Vitis*-Sorte beobachtete, waren auch bei den übrigen untersuchten weiblichen Sorten, besonders häufig aber gerade bei *Riparia pubescens*, zusammenhängende Chromosomen zu finden, die gemeinsam zu einem Pol wanderten (Abb. 16). Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Chromosomen bei der 1. meiotischen Teilung müssen

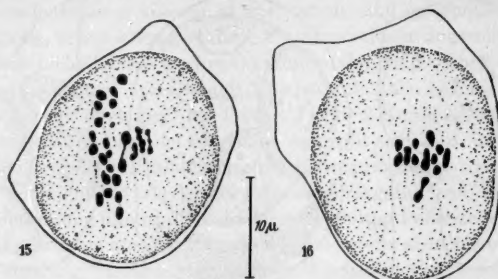


Abb. 15—16. *Vitis riparia*, Sorte *Riparia pubescens* bleu. Pollenmutterzellen.
15 1. meiotische Teilung mit Brückenbildung. 16 Anaphase I mit verklebten Homologen.

in den Metaphaseplatten der 2. meiotischen Teilung sichtbar werden. So konnten in einem besonders günstigen Präparat unter zahlreichen Metaphaseplatten der 2. meiotischen Teilung deren 11 einwandfrei ausgezählt werden. Von ihnen hatten 7 die normale Zahl von 19 Chromosomen; eine besaß ein überzähliges, insgesamt also 20; während 3 einen Verlust erlitten hatten und nur 17 Chromosomen enthielten. Einzelchromosomen waren in diesen Pollenmutterzellen nicht zu finden. Die beiden Spindeln der 2. meiotischen Teilung stehen, von seltenen Ausnahmen abgesehen, senkrecht aufeinander. Daher war bei jeder von diesen 11 Pollenmutterzellen nur eine Platte auszählbar, während die andere in Seitenansicht erschien. Bei der 2. meiotischen Teilung wurden vereinzelt auch pyknotische Erscheinungen beobachtet: die Metaphasechromosomen waren gelegentlich zu einigen Ballen verklumpt. In den Tetraden fanden sich fast nur normale Pollenzellen; ganz selten wurde eine etwas eingedellte beobachtet. Ebenso zeigten auch die freiwerdenden Pollenzellen zunächst noch keine Degenerationserscheinungen.

An einzelnen jungen Pollenkörnern traten kurz nach dem Verlassen der Tetrade Bildungen auf, die eine auffallende Ähnlichkeit hatten mit den ersten Anlagen der Keimfurchen bei fertilen Pollenkörnern. Wäh-

rend bei den Pollenkörnern keimungsfähiger Sorten sich dann alsbald die charakteristischen Formveränderungen und Membranverdickungen herausbilden, bleibt bei *Riparia pubescens* die kugelige Form zunächst erhalten und es setzen dann Eindellungen ein, die an beliebigen Stellen des Pollenkorns beginnen können. Die „Keimfurchenanlagen“ traten nur bei einem kleinen Prozentsatz der Pollenkörner auf; meist einzeln oder zu zweien; gelegentlich fanden sich aber auch deren 3, die dann gleichmäßig über die Peripherie des Querschnitts verteilt waren. Bei Sorten mit fertilen Pollen erfolgt gleichzeitig mit der Herausbildung der charakteristischen Form des Pollenkorns auch die Teilung des primären Pollenkerns (BARANOV und RAJKOVA 1929). Bei *Riparia pubescens* erfolgt zwar keine Weiterentwicklung der Pollenform, wohl aber kann ich bis zu einem gewissen Grade DORSEYs Beobachtungen bestätigen über das Auftreten einer Vakuole in den freien Pollen und über die Degenerationerscheinungen nach der Teilung des primären Pollenkerns. Allerdings waren letztere Fälle in meinem Material sehr selten; die meisten Pollenkörner deltten sich bereits vor Erreichung dieses Stadiums ein, und ihre Kerne degenerierten.

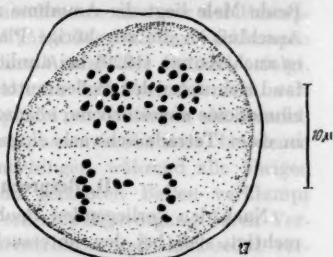


Abb. 17. Oberlin 595 F₂. Pollenmutterzelle. Anaphase II. Oben: Platten mit 18 und 20 Chromosomen; unten: 2 im Äquator zurückgebliebene Chromosomen.

5. Oberlin 595 F₂ ♀. (F₂-Hybride aus *Vitis riparia* MICHX. × *Vitis vinifera* L., Sorte Gamay noir.)

Bei diesem Stock traten alle bisher erwähnten Degenerationerscheinungen auf ohne irgendwelche speziellen Besonderheiten. Abb. 17 stellt den aus technischen Gründen sehr seltenen Fall dar, daß beide Platten einer Teilungsfigur einwandfrei auszählbar waren und noch dazu eine Unregelmäßigkeit zeigten. Bei der dargestellten Anaphase II sieht man die eine Spindel fast in Polansicht. Die linke Platte enthält 18, die rechte 20 Chromosomen. Die beiden Platten sind in der Zeichnung etwas auseinandergerückt. In Wirklichkeit überdeckten sie sich mit einem kleinen Sektor. Da aber die beiden Platten der Höhe nach etwa 10 μ Abstand voneinander hatten und sämtliche Chromosomen einer jeden Platte in einer Ebene lagen, waren die Platten optisch leicht und sicher voneinander zu trennen. Auffällig war bei diesem Stock noch, daß die Metaphaseplatten, besonders die der 1. meiotischen Teilung, sehr verschieden dicht gelagert waren. Als Extremwerte wurden Plattendurchmesser von 6,8 und 11,9 μ gemessen.

6. *Vitis vinifera* L., Sorte *Riesling*.

Von einem Klon dieser zwittrigen Sorte wurden zum Vergleich eine große Anzahl von Blütenknospen untersucht. Unter Tausenden von Pollenmutterzellen in geeigneten Stadien wurden nur 2 abweichende Bilder gefunden, und zwar bei der 1. meiotischen Teilung. In einem Falle waren bei einer frühen Anaphase I 2 Chromosomen im Äquator zurückgeblieben. Im 2. Falle handelte es sich um eine späte Anaphase I, bei der sich ein Chromosom halbwegs zwischen der Äquatorebene und den dicht geschlossen liegenden übrigen Anaphasechromosomen fand. Beide Male liegt die Annahme nahe, daß die Einzelchromosomen den Anschluß an die zugehörige Platte noch gefunden haben würden, wie es auch KOBEL (1929) bei ähnlichen Fällen vermutet hat. Ganz selten fand sich unter den Pollenmutterzellen nach der 2. meiotischen Teilung einmal eine abgestorbene; ebenso selten war gelegentlich eine Pollenzelle in einer Tetrade schwach eingedellt.

D. Besprechung der Ergebnisse.

Nach den vorliegenden Beobachtungen erscheint die Annahme berechtigt, daß bei den untersuchten weiblichen *Vitis*-Sorten in einem Chromosom, dem X-Chromosom (BREIDER und SCHEU 1933), ein recessives Gen oder Genkomplex lokalisiert ist, wodurch im homozygoten Zustand primär oder sekundär alle beschriebenen Degenerationsercheinungen in den Pollenmutterzellen und in den Pollen verursacht werden. Beeinflußt wird einmal der Verteilungsvorgang der Chromosomen in den Pollenmutterzellen und zum anderen die postmeiotische Entwicklung der Pollen.

Die bei der Meiose auftretenden Anomalien können zwanglos als Folge von Spindeldefekten erklärt werden. Wenn isolierte Chromosomengruppen auftreten (Abb. 2), so können diese Kleinkerne bilden. Man könnte bei Abb. 2 auch auf den Gedanken kommen, daß die Chromosomengruppe gar nicht erst in die Metaphase mit einbezogen worden sei, die Störung des Spindelmechanismus also schon in der Prophase begonnen hätte. Einzelne Chromosomen (Abb. 1, 2) finden eventuell wieder Anschluß an die zugehörige Platte oder sie geraten in das Plasma, wo sie früher oder später aufgelöst werden dürften. Verschiedentlich wurden Chromosomen beobachtet, die der Zellmembran direkt anlagen, so daß man versucht wäre, an die Möglichkeit einer Ausstoßung zu denken, die aber unwahrscheinlich ist, da die Membran der Pollenmutterzelle meist bereits beträchtlich verdickt war. Es wurden mehrfach Einzelchromosomen neben Prophasen II beobachtet, die also zweifellos die Interphase überdauert hatten. Daß keine Auflösung erfolgt ist, könnte damit zusammenhängen, daß zwischen den beiden meiotischen Teilungen kein typischer Ruhekern gebildet wird und dementsprechend auch der Formwechsel der Einzelchromosomen nicht bis zu auflösbaren Stadien fort-

schreitet. Bei der 2. meiotischen Teilung konnte mehrfach beobachtet werden, daß die Einzelchromosomen die Formveränderungen der Chromosomen in der Teilungsfigur mitzumachen begannen (Abb. 7). Es ist sehr wahrscheinlich, daß sie dabei degenerieren und vom Plasma resorbiert werden. Zwar konnte derartige nicht direkt beobachtet werden, doch lehrt das Verhalten absterbender Ruhekerne, daß Chromosomen in diesem aufgelockerten Zustand beim Degenerieren schnell schlechter färbbar und bald völlig unsichtbar werden.

Während Ruhekerne und Einzelchromosomen in entsprechenden Formwechselstadien auf diese unauffällige Weise resorbiert werden, treten beim Degenerieren von Metaphasechromosomen vor der Resorption erst deutliche Verklumpungen auf (Abb. 3). Daß das Verklumpen von Chromosomen unabhängig von dem Ausfall der Spindel erfolgt, wäre durchaus denkbar; allerdings konnte bei Vorhandensein verklumpter Chromosomen niemals eine Spindel oder auch nur ein Spindelrest gefunden werden. Es wurden Metaphasen beobachtet, bei denen 2 normal färbare Homologe zusammenhängen, während alle übrigen Chromosomen zu wenigen, abweichend gefärbten Ballen verklumpt waren. Wahrscheinlich beginnt der Verklumpungsvorgang durch Verkleben der Matrix, die ihre Oberflächenstruktur und -konsistenz verändert. Solche beginnenden Verklebungen führen offenbar auch dazu, daß Chromosomenplatten nicht in paralleler Lage zueinander die Anaphasebewegung durchlaufen (Abb. 1) und daß Homologe gemeinsam zu einem Pol wandern (Abb. 16). Normalerweise sind bei *Vitis* zu Beginn der Anaphase sämtliche Chromosomen nicht nur deutlich getrennt, sondern auch bereits vollständig abgerundet.

Durch den Transport verklebter Homologer zu einem Pol wird mit beigetragen zur Bildung ungleich großer Kerne. In der Hauptsache dürfte deren Entstehung aber in der ungleichmäßigen Verteilung nicht-zusammenhängender Homologer begründet sein; denn verklebte Homologe sind doch relativ selten und insbesondere konnten sie bei der *vinifera*-Sorte *Madeleine angevine* mit den auffallenden Unterschieden in der Kerngröße (Abb. 6) überhaupt nicht beobachtet werden. Wenn nur wenige Chromosomen ungleich verteilt werden, so wird sich das in der Kerngröße zwar kaum bemerkbar machen, es könnte aber für den weiteren Entwicklungsablauf doch entscheidend werden.

Anschließend an Kerndegenerationen verändert sich auch das Plasma und die tote Pollenmutterzelle wird offenbar aufgelöst. So findet man zwischen Pollenmutterzellen, die die 2. meiotische Teilung durchlaufen, noch abgestorbene Metaphasen I. In Antheren mit späteren Stadien, etwa während der Tetradenbildung, sind keine degenerierten Pollenmutterzellen mehr nachweisbar. Ihre Auflösung dürfte durch den Antherensaft (DORSEY 1914) erfolgen, der im normalen Ablauf der Entwicklung neben seiner ernährenden Funktion eine quellende und

auffösende Wirkung zum mindesten auf die Membran der reifen Tetrade ausübt. Leere Tetradenmembranen findet man nur während des Freiwerdens der Pollenzellen. In älteren Antheren, die nur freie Pollen und keine Tetraden mehr enthalten, waren solche Membranen nicht mehr nachzuweisen. Ihre Auflösung muß also sehr schnell vor sich gehen.

Durch Unterdrückung oder Versagen der Spindel unmittelbar vor Beginn der Anaphase kommt es zur Bildung von Großkernen. In seltenen Fällen traten diese bei der 1. meiotischen Teilung auf. Derartige Kerne scheinen dann nicht mehr teilungs-, wohl aber lebensfähig zu sein. So fanden sich zwischen reifen Tetraden vereinzelt Pollenmutterzellen deren Membran durchaus der einer normalen Tetrade glich; dagegen war der Plasmaleib relativ klein und besaß nur einen, aber abnorm großen Kern. Ähnliches beschreibt HOLMGREN (1919) für 2 *Erigeron*-Arten bei Blüten, die den Übergang bildeten zwischen zwittrigen Scheibenblüten und weiblichen Strahlblüten eines Köpfchens. In der 2. meiotischen Teilung entstehen bei den untersuchten *Vitis*-Sorten relativ häufig Großkerne. Diese führen dann zur Bildung von Doppelpollen mit einem Kern, der mehr oder weniger diploid ist. Genau diploid muß er nicht sein, da ja bei der 1. meiotischen Teilung Unregelmäßigkeiten geringfügiger Art vorgekommen sein können. Eine Entstehung der Großkerne durch Verschmelzen zweier normaler Pollenmutterzellkerne erscheint unwahrscheinlich angesichts der Doppelpollen mit 2 Kernen und der Tatsache, daß Kleinkerne keinen Anschluß an die oft dicht danebenliegenden zugehörigen Kerne finden. Bei der Bildung von Doppelpollen mit 2 Kernen ist die 2. meiotische Teilung noch vollständig normal abgelaufen und erst während der simultanen Wandbildung traten Störungen auf. Nach Bildern wie Abb. 5 ist es wahrscheinlich, daß die Tochterkerne aus der 2. meiotischen Teilung zusammen in einen Doppelpollen gelangen, da die Doppelpollen annähernd senkrecht zueinander liegen, entsprechend der Spindelstellung bei der 2. meiotischen Teilung. Solche ungewöhnlichen Bilder wie Abb. 12 können ihre Erklärung in der Annahme finden, daß die Spindelwirkung während des Ablaufs der Metaphase ausgesetzt hat.

Alle diese Meiosestörungen, die bei *Vitis*-Weibchen genisch bedingt und mit der Geschlechtsbestimmung verknüpft sind, finden sich bei anderen botanischen Objekten als Folge experimenteller Eingriffe (TISCHLER 1934, 1942).

Die nach Beendigung der meiotischen Teilungen auftretenden Anomalien können zum Teil auf die durch einen Spindeldefekt entstandenen chromosomalen Störungen zurückgeführt werden. So erklären sich z. B. leicht verschiedene Anzahlen (Abb. 11, 14) oder das Absterben eines einzelnen oder zweier zusammengehöriger Pollen (Abb. 9) einer Tetrade.

Die wesentlichsten Degenerationserscheinungen der postmeiotischen Pollenentwicklung dürften aber auf direkte, primäre Wirkungen des

rezessiven Gens oder Genkomplexes zurückzuführen sein. Es sind da vor allem zu nennen: das Absterben der Pollenmutterzellen während der simultanen Wandbildung; die Eindellung sämtlicher Pollenzellen normaler Tetraden mit Absterben der Kerne bei den weiblichen *vinifera*-Sorten und die prinzipiell gleichartigen Degenerationserscheinungen an den freigewordenen jungen Pollenkörnern bei *Vitis riparia*. Bei der Frage nach den Ursachen der späten Anomalien ist zu bedenken, daß man nicht beurteilen kann, wie viele Meiosen tatsächlich ungestört verlaufen sind, da, wie erwähnt, geringe Verluste oder Ungleichmäßigkeiten bei der Chromosomenverteilung die Kerngröße nicht nachweisbar beeinflussen werden. Daß Chromosomenverlust aber auch nicht unbedingt zu frühzeitigen Schäden führen muß, zeigen Tetraden mit einem überzähligen und 4 normalen Pollenzellen (Abb. 14). Spätestens bei der 2. meiotischen Teilung haben in diesem Falle 2 Kerne eine Anzahl von Chromosomen eingebüßt; trotzdem sind Tetradenbildung und -reifung normal abgelaufen. In einer Reihe von Fällen waren in solchen Pentaden alle 5 Pollen normal gestaltet, während in anderen Tetraden derselben Anthere bereits Eindellungen aufgetreten waren. Die wenigen freien Kleinkernpollen, die aufgefunden wurden, waren sämtlich eingedellt. Dieser ganze Ablauf vom Kleinkern bis zum relativ spät degenerierten Pollenkorn spricht stark dafür, daß es sich um gonische Letalität handelt, daß die hauptsächliche Wirkung des erschlossenen Gens oder Genkomplexes die postmeiotischen Stadien der Pollenentwicklung betrifft. Mehr als einen überzähligen Kleinkern habe ich nicht gefunden. KOBEL (1929) weist ausdrücklich darauf hin, daß er überhaupt keine Kleinkerne beobachtet habe. NEGRUL (1930) erwähnt als einzige Abnormität, daß in einer Anthere der Sorte *Oberlin 595* (F_1 -Hybride aus *Vitis riparia* MICHX. \times *Vitis vinifera* L., Sorte *Gamay noir*) „in einem Fall Pentaden und Hexaden angetroffen“ wurden.

Frühzeitig in der Tetrade abgestorbene Pollenzellen (Abb. 9) dürften, soweit sie nicht der Auflösung im Antherensaft verfallen, die deformierten, nicht quellungsfähigen Pollenkörner liefern, während die später eingedellten, im trockenen Zustand ebenfalls deformierten Pollenkörner offenbar auch beim Stäuben der Antheren noch Plasmareste enthalten; jedenfalls bleiben sie quellungsfähig.

Die untersuchten weiblichen Sorten zeigen in den meiotischen und in den postmeiotischen Entwicklungsstadien der Pollen einen verschiedenen Ausprägungsgrad der geschilderten Störungen; am auffälligsten ist wohl der Unterschied zwischen den europäischen Sorten mit starken Anomalien bei der Tetradenbildung und -reifung und den amerikanischen, bei denen erst die jungen, noch in normalem Zustand freigewordenen Pollen degenerieren. Da sämtliche Sorten dicht zusammen angepflanzt waren und somit unter denselben Umweltbedingungen standen, dürften derartige Unterschiede innere, erblich bedingte Ursachen haben.

Die nachgewiesenen Abweichungen vom Normalverlauf der Meiose und der Pollenbildung sind nicht häufig¹ genug, um als alleinige Ursache für die Sterilität des Pollens der weiblichen Rebensorten gelten zu können. Es dürfte vielmehr anzunehmen sein, daß es sich bei den aufgezeigten Störungen nicht um die einzige und allein entscheidende, sondern nur um die eine, cytologisch nachweisbare Wirkung unter einer Reihe von Folgen einer Erbänderung handelt. Eine andere Folge stellt z. B. das Fehlen von Keimporen und -furchen bei den reifen Pollenkörnern dar, ebenso auch die erwähnte Veränderung in der Stellung und Länge der Antheren.

In der Vitaceengattung *Cissus* findet man bei physiologisch weiblichen Sorten noch extremere Verhältnisse in der Entwicklung der männlichen Organe als bei *Vitis*. So enthalten z. B. die Antheren von *Cissus Voinieriana* VIALA nur noch ganz selten einige wenige Pollenmutterzellen. Die Degenerationserscheinungen betreffen hier wahrscheinlich schon das sporogene Gewebe (WAGNER, unveröffentlicht).

Zusammenfassung.

1. Bei allen untersuchten weiblichen Rebensorten treten chromosomale Störungen während der Meiose und Abnormitäten bei der Entwicklung des Pollens auf. Bei den verschiedenen Sorten sind diese Anomalien in den einzelnen Stadien verschieden stark ausgeprägt.

2. Die beschriebenen degenerativen Vorgänge lassen sich grundsätzlich in meiotische und postmeiotische Vorgänge einteilen. Sie können als primäre bzw. sekundäre Wirkungen eines im X-Chromosom lokalisierten rezessiven Gens oder Genkomplexes aufgefaßt werden.

3. Die Unregelmäßigkeiten während der meiotischen Teilungen lassen sich zwanglos als Folge von Spindelstörungen erklären. Es können Chromosomen zurückbleiben oder vorausseilen, wobei sie in beiden Fällen aus dem Bereich der Spindel heraus geraten können und dann wahrscheinlich der Resorption durch das Plasma verfallen. Trennt sich eine größere Gruppe von Chromosomen von der Teilungsfigur, so kann es zur Bildung von Kleinkernen kommen, die schließlich überzählige 5. Pollen in der Tetrade liefern. Chromosomenverlust und unregelmäßige Verteilung führen zur Bildung ungleich großer Kerne. Bei Versagen der Anaphasebewegung können diploide Pollenkerne entstehen und als Folge davon Doppelpollen mit einem Kern.

4. Die nach Beendigung der Meiose erfolgenden Degenerationserscheinungen dürften nur zum Teil sekundär, d. h. auf die chromosomalen Störungen der Meiose zurückzuführen sein, im übrigen aber direkte Wirkungen des in Frage stehenden Gens bzw. Genkomplexes

¹ Die zahlenmäßige Erfassung der gestörten Meiosen und die statistische Auswertung des Materials ist beabsichtigt.

darstellen. Während der simultanen Wandbildung in der Tetrade treten Degenerationerscheinungen auf. Durch anomale Wandbildung entstehen Triaden und Dyaden. Die dabei gebildeten Doppelpollen können ein- oder zweikernig sein, die Kerne dementsprechend diploid oder haploid. Während der Tetradenreifung setzen Schrumpfungen und Eindrückungen ein. Beim Freiwerden der Pollen aus der Tetrade sind bei europäischen Sorten nur noch eingedellte Pollen vorhanden. Bei amerikanischen Sorten sind unter den eben freigewordenen Pollen viele für dieses Stadium normale kugelige zu finden, von denen einige noch die Teilung des primären Pollenkernes durchlaufen, ehe sie degenerieren.

5. Die cytologisch nachgewiesenen Erscheinungen stellen nur eine unter einer Reihe von Auswirkungen der erfolgten Erbänderung dar. Als weitere Folgen sind z. B. anzusehen: das Fehlen der Keimporen und -furchen bei den reifen Pollen und die abnorme Stellung und Länge der Antheren in der Blüte.

Literatur.

- BARANOV, P. and H. RAJKOVA: The „male“ flowers of grapes. Bull. appl. Bot., Genet. a. Plant-Breed 24, 183—198 (1929/30) (russisch). — BREIDER, H.: Über Pollenfertilität der Rebenarten und ihrer F_1 -Bastarde. Züchter 12, 209—212 (1940). — BREIDER, H. u. H. SCHEU: Die Bestimmung und Vererbung des Geschlechts innerhalb der Gattung *Vitis*. Gartenbauwiss. 11, 627—671 (1938). — DORSEY, M. J.: Pollen development in the grape with special reference to sterility. Univ. Minnesota Agric. Exp. Stat., Bull. 144, 1—60 (1914). — Pollen-sterility in the grape. J. Hered. 6, 243—249 (1915). — GOLLMICK, F.: Auftreten von deformierten Pollen bei *Vitis*-Arten und -Bastarden. Weinbau (Wissensch. Beih.) 3, 76—83 (1950). — HOLMGREN, J.: Zytologische Studien über die Fortpflanzung bei den Gattungen *Erigeron* und *Eupatorium*. Kungl. svenska Vetenskapsakad. Handl. 59, Nr 7 (1919). Zit. nach SCHNARF 1929. — HUSFELD, B.: Über die Züchtung plasmoparawiderstandsfähiger Reben. Gartenbauwiss. 7, 15—92 (1933). — IVANOVA-PAROISKAJA, M.: The sterility of the pollen in the „female“ grape varieties of Asia-media. Bull. appl. Bot., Genet. a. Plant-Breed 24, 93—166 (1929/30) (russisch). — KACZMAREK, A.: Zur Frage der Keim- und Befruchtungsfähigkeit des Pollens der weiblichen Rebenblüte. Gartenbauwiss. 11, 483—522 (1938). — KIRCHHEIMER, F.: Die nördlichsten Standorte der wilden Rebe (*Vitis silvestris* Gmelin). Wein u. Rebe 26, 15—22 (1944). — KOBEL, F.: Zytologische Untersuchungen als Grundlage für die Immunitätszüchtung bei der Rebe. Landwirtsch. Jb. Schweiz 43, 232—272 (1929). — KRAUSE, E. H.: Mutmaßliche Stammformen der Weinrebe. Naturw. Wschr., N. F. 1912. Zit. nach DE LATTIN 1950. — DE LATTIN, G.: Über die Sterilität des Pollens bei reinen Arten und Artbastarden der Gattung *Vitis*. Weinbau (Wissensch. Beih.) 4, 106—121 (1950). — LEVADOUX, L.: Etude de la fleur et de la sexualité chez la vigne. Ann. Ecole nat. Agric. Montpellier 27, 1—89 (1946). — NEGRUL, A. M.: Chromosomenzahl und Charakter der Reduktionsteilung bei den Artbastarden der Weinrebe (*Vitis*). Züchter 2, 33—43 (1930). — SCHNARF, K.: Embryologie der Angiospermen. Berlin: Gebrüder Bornträger 1929. — TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie, Bd. I. Berlin: Gebrüder Bornträger 1934; Bd. II. Berlin: Gebrüder Bornträger 1942.

Dr. ERNST WAGNER, Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof,
Siebeldingen über Landau/Pfalz.

From the Biological Laboratory, Fordham University, New York.

SOME EFFECTS OF COLCHICINE ON THE METAMORPHOSIS
OF *CULEX PIPIENS* LINN*.

By

JOSEPH E. SCHUH**.

With 6 figures in the text.

(Eingegangen am 31. August 1951.)

In a study of the metamorphosis of *Culex pipiens*, HOLT (1917) reported that the number of chromosomes in the cells of the pupal intestine was considerably increased. She called these polyploid groups of chromosomes multiple complexes. The most common chromosome numbers in these multiple complexes were reported as 12, 24 and 48. BERGER (1938) reinvestigated these multiple complexes and studied their origin and fate. He demonstrated that they arise by repeated duplication in the resting stage and found evidence that they did not undergo cytolysis, as HOLT (1917) had surmised, but divided and became incorporated into the adult hind-gut. During the long larval period of approximately ten days, the cells of the epithelium of the ileum undergo a great increase in size but do not increase in number. At the beginning of metamorphosis, the number of cells in the lining of the ileum is apparently the same as in the youngest larva in which a count could be made. During metamorphosis by a series of rapid divisions these large larval cells give rise to a larger number of small cells which form the adult hind-gut. BERGER referred to these divisions as somatic reduction divisions.

Further confirmation of the occurrence of somatic reduction in the ileum of *Culex* was presented by GRELL (1946). Meiotic and ordinary divisions revealed no evidence of the occurrence of endomitosis in the strict sense as originally described by GEITLER (1939), that is, she found no evidence of an endoprophase, endometaphase, endoanaphase or endotelophase. The characteristic somatic pairing of the Diptera was effective throughout the multiple complex cell cycle as well as in the somatic and spermatogonial cell cycles. During the short interphase between first and later divisions she found no evidence of duplication of chromosomes, but the chromatids (anaphase chromosomes, called "later

* Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of Biology, Fordham University.

** Present address: Biology Department, St. Peter's College, Jersey City 6, New Jersey.

division chromatids" by GRELL) which paired at anaphase undergo closer association or somatic synapsis. Thus the essential difference between somatic reduction and normal mitosis is the substitution of somatic synapsis for duplication of chromosomes at interphase.

The inhibition of spindle formation by colchicine without hindering the normal chromosomal cycle suggested its possibilities as a tool for an experimental study of the unique phenomenon of somatic reduction and the cytological behavior of the chromosomes of the multiple complexes. If there were no duplication of chromosomes during the short interphase between the divisions of the multiple complexes, then the ordinary result of colchicine treatment, induction of polyploidy, should not occur. Secondly, if the colchicine inhibited spindle formation, then the effect of somatic reduction in the metamorphosis of the ileum, the production of a larger number of small cells from the large multiple complex cells, should be prevented. Hence a reinvestigation of the division of these multiple complex cells was undertaken and the effects of colchicine on them were studied.

Material and Methods.

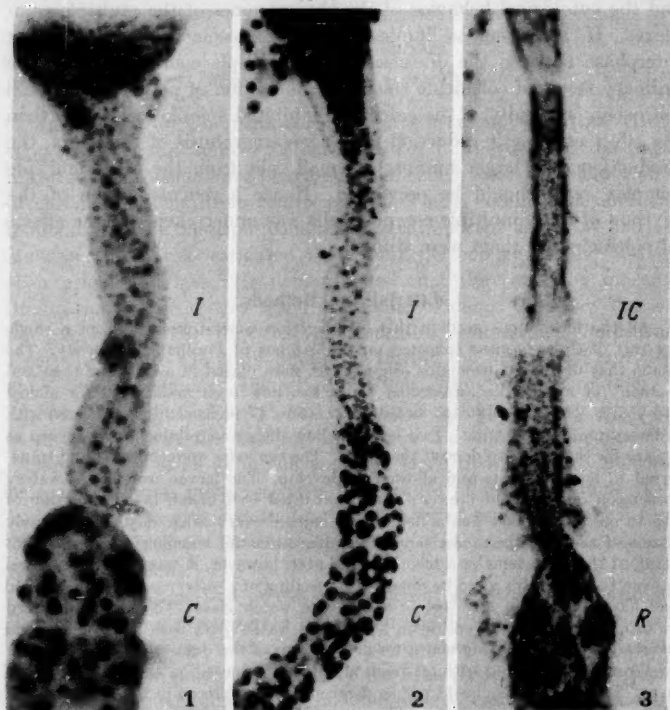
All the mosquitoes used in this investigation were descended from a single egg raft of *Culex pipiens* collected on the campus of Fordham University. The adults that developed from this original raft were placed in a breeding cage and a colony of mosquitoes established which has now been maintained for almost two years. The breeding cage measured $27 \times 36 \times 47$ inches and was covered with ordinary mosquito netting. Two large shallow dishes containing water served as a place for the adults to deposit their eggs. The egg rafts were collected and transferred to large tall jars and allowed to develop. The larvae were fed a watery suspension of powdered brewer's yeast and dried beef blood, in a proportion of two to one. This food was added to the culture every other day. In the early phases of the investigation a canary was placed in the breeding cage over night to afford the adult females a blood meal. Later, however, it was found that equal or even better results could be obtained by feeding of a watery suspension of dried beef blood, placed in the cage in a Syracuse watch glass. The adults were fed by saturating absorbent cotton in a Syracuse watch glass with sugar water and inverting it on the netting which formed the top of the cage.

Pupae were isolated within fifteen minutes after pupation and kept for treatment. Those whose age could not be determined were placed in the breeding cage for maintenance of the colony. The pupae were treated for varying periods of time and at various stages before and during metamorphosis of the ileum and colon with a 0.25 per cent solution of colchicine in BUCK's (1942) modification of Ringer solution. By means of a fine needle, held in a two-way micromanipulator a hole was pierced in the intersegmental membrane between the second and third or third and fourth abdominal segments to allow penetration of the colchicine. The pierced pupae were placed in a vial containing about 5 cc. of the colchicine solution. For controls, pupae were placed in a vial containing BUCK's Ringer solution for the same period of time as those placed in the colchicine solution. For purposes of comparison the alimentary tracts of normal pupae were dissected and prepared at ages comparable to the treated material.

Feulgen total mounts of the hind-guts were prepared according to the technique described by BERGER (1938). All photomicrographs were taken with a Leitz Macca camera using Kodak "M" plates. A green filter was used in taking all photomicrographs.

Observations and Results.

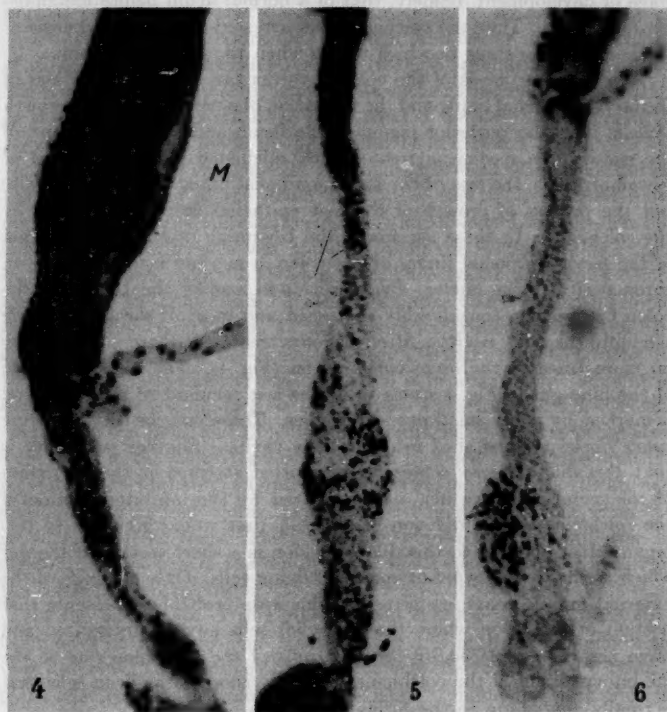
BUCK's (1942) modification of Ringer solution was used as the solvent for the colchicine. To test whether the effects produced by the treatment



Figs. 1-3. *Culex pipiens*. Photomicrographs of Feulgen total mounts. $\times 125$. Fig. 1 normal ileum and portion of colon of 4 hour pupa; before metamorphosis. Fig. 2 same of 8 hour pupa; mid-metamorphosis. Fig. 3 normal hind-gut of 14 hour pupa; after metamorphosis. C colon; I ileum; IC ileo-colon; R rectum.

were due solely to the colchicine and not to the solvent, controls were run in the following manner. After piercing the cuticle, the pupae intended for controls were placed in BUCK's Ringer solution without colchicine for the same period of time as those placed in the colchicine. Normal metamorphosis occurred in these controls.

The changes undergone by the hind-gut during normal metamorphosis were reinvestigated as a basis of comparison between the normal (Fig. 1—3) and the treated (Fig. 4—6) material. The findings were in agreement with BERGER's (1938). In the present investigation, however, the time of the beginning of the metamorphosis of the ileum was found to be as much as 4 hours earlier than the time reported by BERGER (1938).



Figs. 4—6. *Culex pipiens*. Photomicrographs of Feulgen total mounts. $\times 125$. Fig. 4 mid-gut and hind-gut of 2 hour pupa treated with 0.25 per cent solution of colchicine for 12 hours. Fig. 5 hind-gut of 8 hour pupa treated with 0.25 per cent solution of colchicine for 6 hours. Fig. 6 hind-gut of 13 hour pupa treated with 0.25 per cent solution of colchicine for 1 hour. M mid-gut.

One-half hour and two hour pupae treated for varying periods of time all showed the same effects. Ileae of pupae treated one-half hour after pupation for $13\frac{1}{2}$ hours contained relatively few large cells with large polyploid nuclei instead of the numerous small cells found in a normally metamorphosing gut after approximately the same interval of

time. Their condition was similar to that of a normal ileum before metamorphosis. In another series of experiments two hour old pupae were treated in the same manner for varying intervals ranging from 6 to 24 hours. Despite the difference in ages of the pupae at the time when these guts were dissected and despite the variation in time of exposure to the colchicine, the ilea of all appeared to be in the same stage of development, namely, that of a normal ileum before metamorphosis (Fig. 1). Thus the colchicine had arrested the metamorphosis of the ileum at the stage in which it was when the treatment began.

The metamorphosis of the colon involves two processes, the loss of the larval epithelial lining and the formation of a new one by an ingrowth of cells from the posterior region of the ileum and the anterior end of the rectum. In specimens treated with colchicine before the onset of metamorphosis, the loss of the larval epithelial lining proceeds normally but the process of growth of the new epithelial lining is inhibited by the colchicine. In these specimens the beginning of the disintegration of the larval epithelial lining of the colon is marked by an increase in chromaticity of the nuclei. Pycnosis sets in and by the 11th hour the colon has become considerably shortened and most of the larval lining shed into the body cavity. After 12 hours treatment there is apparently no more trace of the large colon nuclei (Fig. 4). The dilated portion of the hind-gut in Fig. 4 seems to be the last remnant of the colon and is marked by many small pycnotic bodies. These may be disintegrating colon nuclei not yet shed into the body cavity. Another possibility is that this dilation may represent an aborted attempt at the formation of the rectal pouch, which was prevented by the inhibitory action of the colchicine on the division of the cells that would give rise to this organ. Just anterior to this dilated region is a short section of the gut which seems to be devoid of epithelial lining cells. Only the cells of the external muscle coats are present. This area probably represents that portion of the colon where the epithelial cells have disintegrated and have not been replaced by the new cells of the ileo-colon due to the inhibitory action of the colchicine on the division of the ileac cells that normally contribute to the formation of this new tissue.

In pupae treated with a 0.25 per cent solution of colchicine after metamorphosis had begun, the metamorphosis of the ileum was arrested at that stage in which it was when the treatment was begun. If the treatment was initiated shortly after metamorphosis began, there was a slight increase in the number of cells and in the number of smaller sized nuclei in the ileum in comparison with specimens in which treatment was begun before metamorphosis. As the time between pupation and the beginning of the treatment was increased, the number of cells present in the ileum became greater and there was a tendency toward greater

uniformity in the size of the nuclei. The duration of the treatment did not influence these results. Fig. 5 shows an ileum of an eight hour pupa treated for six hours. The number of cells has increased considerably in comparison with the ileum shown in Fig. 4 and the nuclei have become smaller and more uniform in size. This ileum (Fig. 5), though taken from a 14 hour pupa, more closely resembles the condition of the ileum of the normal eight hour pupa (Fig. 2) than that of the normal 14 hour pupa (Fig. 3).

Pupae, 12 and 13 hours old, although treated for different lengths of time, manifested the same results. In these specimens the ileo-colon has almost been completed before the treatment began. The condition of the ileo-colon in a 12 hour pupa treated for two hours (Fig. 6) is very similar to that found in the normal 14 hour pupa (Fig. 3).

In this group of experiments, in which treatment was begun during the metamorphosis of the ileum and colon, the colon behaved quite normally. The large epithelial colon cells underwent disintegration but one significant difference was noted between the results of this experiment and those reported above in which treatment was begun before the onset of metamorphosis. In the latter case there was no ingrowth of the new ileo-colon tissue. In the present experiments where the new epithelial tissue of the ileo-colon had begun to form prior to treatment, the ileo-colon was more or less completed depending on the amount of development it had undergone at the time when treatment was begun (Fig. 5 and 6). In 12 and 13 hour pupae, multiple complex c-metaphases were found in the region formerly occupied by the colon. These multiple complex cells probably migrated into this region from the ileum and rectum and were undergoing their somatic reduction divisions when the colchicine affected them. There was a very noticeable accumulation of arrested metaphases in the hind-guts of these specimens as a result of the colchicine treatment.

In the last stages of this investigation there were indications that the effects of the colchicine treatment on the multiple complex cells were different in some respects from colchicine effects in plants. Dividing plant cells treated with colchicine are blocked at metaphase; the division of the SA-region, though delayed, occurs and a resting nucleus is formed but cytokinesis does not occur. Because of this, the anaphase chromosomes are included in one nucleus instead of two, resulting in a polyploid cell. This cell can undergo successive mitotic cycles and, as long as the colchicine is present, the chromosome number will be doubled in each cycle. In the present material, however, the evidence seems to point to a failure of the induction of higher degrees of polyploidy in the multiple complex cells after the division of the SA-regions in the first division. This is readily understood since there is no reduplication of

chromosomes between the successive divisions of the multiple complexes due to the absence of a metabolic resting stage in which chromosome duplication would normally occur. Further experiments are under way to obtain more complete data on this point, but it seems well to include a preliminary report here. Three lines of evidence indicate the absence of such repeated induction of polyploidy with prolonged colchicine treatment. First is the prevalence of $16n$ and $8n$ complexes in the normal ilea as well as in the colchicine treated ilea. GRELL (1946) reports the same for normal ilea. After treatment this condition is not changed. Secondly, the diameter of the resting nuclei of the ileac cells never increased to any appreciable extent even after prolonged treatments. The range of the nuclear diameters was between 3.5 and 17.5 micra in both normal and treated ilea. The larger nuclei predominated in the early stages of metamorphosis and the smaller in the later and post metamorphic stages. Further analysis showed that in specimens treated before metamorphosis the range of the nuclear diameters was between 7 and 17.5 micra; in specimens treated after the onset of metamorphosis there was a narrowing of this range from 3.5 to 10.5 micra and in specimens treated after metamorphosis was well advanced (12 and 13 hour pupae) there was still further narrowing of this range from 3.5 to 7 micra. Thirdly, there was a manifest failure of cells to initiate another division cycle after being once inhibited by colchicine. Ilea that were influenced by the colchicine after the onset of metamorphosis showed an accumulation of metaphases for about the first two hours after treatment. Specimens that were subjected to the colchicine for longer periods of time had no metaphases. Rarely, one or two metaphases might be found. This was true even in treatments as long as 24 hours. In pupae treated before the beginning of metamorphosis metaphases were found for a longer period of time in extended treatments. Thus in the two hour pupae treated for $7\frac{1}{2}$ hours metaphases were found. But when the treatments were longer than this, no metaphases were found.

Discussion.

It was observed in the present investigation that the metamorphosis of the ileum began at about the fourth hour of pupal life. In occasional specimens it began as early as $3\frac{1}{2}$ hours after pupation. The criterion for the beginning of metamorphosis was the first appearance of cells beginning to undergo mitotic activity. These findings differ from those of BERGER (1938) who reported metamorphosis as beginning about the eighth hour of pupal life. He noted that in determining the time of the different stages of metamorphosis of the mosquito, he found considerable variation, depending on the temperature, and the amount of food present (BERGER 1937). This variability was also observed in the

present investigation. The duration of the larval and pupal stages could be lengthened or shortened by lowering or raising the temperature or by decreasing or increasing the amount of food given to the larvae. The early occurrence of metamorphosis of the ileum in the present investigation was probably due to the fact that all the mosquitoes used were from an inbred stock, raised in the laboratory under uniform and ideal conditions of temperature and food. The temperature of the culture room was never allowed to fall below 21° C. Usually it was maintained between 24° and 30° C. The food supply for the larvae was always abundant.

The treatment of pupae of *Culex pipiens* at different times in the metamorphosis of the hind-gut has shown that the specific effect of colchicine is on the spindle or the mechanism underlying its formation, as postulated by LEVAN and ÖSTERGREN (1943). In the metamorphosis of the ileum of *Culex pipiens*, the large polyploid cells of the larval epithelial lining which are relatively few in number undergo a series of divisions giving rise to numerous small cells which will be incorporated into the adult ileo-colon. The present investigation gives additional evidence for the mechanism by which this is accomplished. According to HURST (1896) the epithelium of the intestine "divides into a thin outer and a thick inner layer. The latter becomes loosened, breaks up and appears to be digested." In 1905, THOMPSON gave a more complete though not completely accurate account of the metamorphosis of the hind-gut of *Culex pipiens*. He considered HURST's explanation too simple and attributed the metamorphosis of the ileum to the elimination of certain epithelial cells and to new cells which were derived from epithelium which escapes destruction. He also reported a difference in size between the nuclei of the reconstructed epithelium and the older cells. Utilizing the new and superior technique of the Feulgen reaction by which he was able to study whole mounts of the hind-gut, BERGER (1938) gave a more accurate and comprehensive description of the metamorphosis of the hind-gut. He found no regenerative cells in the ileum but attributed the origin of the new epithelial lining to the large polyploid cells which are built up during the long resting stage of larval and early pupal life and which during metamorphosis undergo a series of somatic reduction divisions. The colon is lost during metamorphosis; its epithelial cells, with their large BALBIANI type nuclei, degenerating and being sloughed off into the body cavity. The colon is replaced by the division and migration of cells from the ileum and rectum into the region formerly occupied by the colon.

The metamorphosis of the ileum involves an increase in cell number through the somatic reduction divisions of the large polyploid cells of the ileum. The metamorphosis of the colon involves two processes:

first, the disintegration of the larval epithelial lining by histolysis; second, the formation of the new epithelial lining by the migration and division of cells from the ileum and rectum. Thus, two distinct processes can be distinguished in the metamorphosis of the ileum and colon; histolysis in the colon and cell division in the colon and ileum. Colchicine affects the metamorphosis of the ileum and the formation of the new lining of the ileo-colon, but has no effect on the disintegration of the colon epithelium. This difference in response to colchicine indicates that the specific action of the colchicine is on the spindle since the colchicine only affects the metamorphosis of those regions which are dependent on the functioning of the spindle.

In the present material it seems quite clear that the action of the colchicine is dependent on the time when the colchicine is applied rather than on the duration of the treatment. This is clearly manifested in a comparison between pupae of the same absolute age which were treated at different times in the course of pupal life. Fig. 4, 5 and 6 are photomicrographs of Feulgen total mounts of three ilea, each of which has an absolute age of 14 hours. Although all are the same absolute age, all are not in the same stage of metamorphic development. Each was treated at a different time in pupal life and each showed a definite response that could be correlated with the time at which the treatment began. The results follow a common pattern which clearly marks colchicine as a spindle inhibiting agent. Each ileum at the end of fourteen hours resembles in appearance the ileum of a normal pupa of approximately the same age as the treated pupa at the time when the treatment was started. The length of the pretreatment and treatment period in the ilea in Fig. 4 and 6 are approximately reversed. Thus the two hour pupa in Fig. 4 was treated for 12 hours and the 13 hour pupa in Fig. 6 was treated for one hour. The difference between the two is striking. The ileum of the 2 hour pupa was treated before metamorphosis began and resembles an ileum in which metamorphosis has not yet begun (Fig. 1), having a relatively small number of cells with large nuclei of varying sizes, due to varying degrees of polyploidy, and not closely packed. The ileum of the 13 hour pupa (Fig. 6) was treated very late in metamorphosis. The presence of c-metaphases and supercontracted chromosomes in the ileum shows that the colchicine was effective. But the ileum shows no striking difference in gross structure when compared with the normal 14 hour ileum (Fig. 3). It does differ markedly, however, from pupae of the same absolute age which were treated before metamorphosis began (Fig. 4) in having many more cells whose nuclei are all rather small, uniform in size and closely packed. Fig. 5 shows an intermediate condition. An ileum about mid-way through metamorphosis was treated with colchicine for six hours. Again the same general

pattern is visible. The condition of the ileum is not that of a premetamorphic ileum, nor that of an almost completely metamorphosed ileum, but rather, that of an ileum that has come about half way through its metamorphosis (Fig. 3). The cells have increased considerably in number over the condition of the premetamorphic ileum but are not as numerous as those in the fully metamorphosed ileum. The same is true of the nuclei. The number of small nuclei has increased considerably but there is still a good number of larger ones present.

This is significant in the light of our present knowledge of the action of colchicine on cell division and of the theory of somatic reduction of polyploid cells as the ordinary means of metamorphosis in the ileum of *Culex*, as proposed by BERGER (1938) and confirmed by GRELL (1946). It is the accepted opinion of cytologists that the specific action of colchicine is on the spindle or the mechanism underlying its formation. In other words, its effect being primarily on the spindle, cytokinesis is inhibited, but the ordinary chromosomal cycle continues. If, then, during the long resting stage during larval and early pupal life large polyploid nuclei are formed and broken down by a series of somatic reduction divisions during metamorphosis, a means for a very rapid metamorphosis is provided. The necessity of synthesizing new chromatin material between each division is obviated. This naturally speeds up the division cycle and the formation of the spindle apparatus becomes the major process in the metamorphosis of the ileum. GRELL (1946) reported a short interphase between the divisions of these multiple complexes which would indicate the absence of chromosome duplication since the time would not suffice for the synthesis of a new chromosome complex, as in ordinary cell division. According to such an interpretation the spindle is the key mechanism for the completion of metamorphosis of the ileum. Inhibition of spindle formation should lead to an inhibition of the metamorphosis of the ileum, the inhibition of the metamorphic process occurring at whatever point the inhibition of the spindle is placed. If the inhibition occurs early enough, the whole process should be prevented; if it occurs very late, after metamorphosis is well advanced, no noticeable effect should result; if inhibition occurs at an intermediate point, metamorphosis should be inhibited mid-way. This is precisely what has happened, as can be seen from the discussion of the comparative study of the ilea shown in Fig. 4, 5 and 6. This seems to be further confirmation of the occurrence of somatic reduction as a process whereby the metamorphosis of the ileum is normally accomplished in *Culex pipiens*.

The similar effects of colchicine on the multiple complex cells of *Culex* and on the meiotic cells of plants (DERMEN, 1938; WALKER, 1938 and LEVAN, 1939) suggest a similarity between the nature of the

multiple complex cells and meiotic cells. The first division in both involves a long and specialized prophase stage; the second meiotic and the later multiple complex division both lack a metabolic resting stage in which chromosome duplication would normally occur. In the meiotic cells of plants, the meiotic divisions and, in the multiple complex cells of *Culex*, the somatic reduction divisions are suppressed by colchicine, but there is no induction of higher degrees of polyploidy in either after the division of the SA-regions. The reason for this failure of the multiple complex cells to undergo repeated increase of polyploidy in the continued presence of colchicine, as the ordinary somatic cells of plants do, is probably to be found in the absence of a metabolic resting stage between the somatic reduction divisions. The repeated chromosome reduplication during the long resting stage of the larval and early pupal life obviates the necessity for chromosomal duplication which takes place in ordinary mitosis between the somatic reduction divisions. This being so, one of the necessary conditions for the repeated induction of higher degrees of polyploidy in the presence of colchicine would be missing, namely the duplication of the chromosomes in the resting stage following the division of the SA-regions. DERMEN (1938) suggests that in the meiotic cells of plants treated with colchicine there seems to be some inherent factor which prevents the multiplication of chromosomes in meiosis beyond a predetermined number which is twice the diploid number. The sum total of the chromosomes in four microspores produced from a pollen mother cell in a normal plant is twice the diploid number. In other words the sum total of chromosomes in the four microspores is equal to the number of chromatids in the pollen mother cell from which they are derived. Microspores, produced under the influence of colchicine, likewise never contained more than twice the diploid number of chromosomes of the pollen mother cell. The absence of a metabolic resting stage between the first and second meiotic divisions offers the same explanation for the failure to induce a higher degree of polyploidy in the meiotic cells after the division of the SA-regions as in the multiple complexes.

Further studies may provide evidence that the duplication of the chromosomes in the resting stage may act as a stimulus for the initiation of another division cycle which will be arrested again at metaphase if the colchicine is still present. In the present material, this stimulus would be absent since in the normal course of events there is no duplication of the chromosomes during the short interphases between successive divisions.

The absence of metaphases in the ilea of pupae that had been exposed to colchicine for long periods of time raises a question for which the present data have not yet afforded an answer. Up to the present

it has been the opinion of cytologists that colchicine is effective only on the actively dividing cell. Cells in the resting stage are not affected by the colchicine. But when they do begin to divide they are affected at metaphase. The present investigation would seem to indicate that after prolonged treatments cells once blocked at metaphase do not undergo a second c-mitosis while under the influence of colchicine but are blocked in the following resting stage. In normal untreated material the divisions of the multiple complex cells are not synchronous. Consequently some nuclei can be found undergoing their first division very late in metamorphosis. It would seem then that some c-metaphases should be found even when prolonged treatment is given, since some of the multiple complexes should be entering on their first division throughout the greatest part of metamorphosis. The nucleus must be in the physiological condition of division to be affected by colchicine (EIGSTI, 1938). In the present material it seems that three or four hours treatment with colchicine prevents the multiple complex cells of the ileum from coming into the physiological condition necessary for cell division. In specimens in which this effect was noted c-metaphases were found in the mid-gut, where diploid cells prevail. There seems to be a difference, therefore, in the effect of colchicine on these multiple complex cells and on ordinary diploid cells. The matter discussed here is still under investigation. Perhaps it will lead to some clarification of the difference between the first and the later divisions of the multiple complex cells.

Summary.

1. The normal metamorphosis of the ileum of *Culex pipiens* begins about the fourth hour of pupal life. By a series of somatic reduction divisions the large polyploid cells of the ileac epithelium form a much larger number of much smaller cells which form the new epithelium.
2. The colon epithelium disintegrates and is replaced by cells which arise by multiplication and migration into the colon from the posterior end of the ileum and the anterior end of the rectum.
3. Normal metamorphosis occurred in the hind-gut of pupae treated with BUCK's modification of Ringer solution, which was the solvent for the colchicine used in this investigation.
4. In pupae treated with a 0.25 per cent solution of colchicine before metamorphosis began, the metamorphosis of the ileum was inhibited and the ilea remained in the premetamorphic condition. The epithelial tissue of the colon underwent normal disintegration but the ingrowth of the new tissue was inhibited.
5. In pupae treated with a 0.25 per cent solution of colchicine during metamorphosis the metamorphosis of the ileum was arrested at the

stage of development in which it was when the treatment began. Disintegration of the colon continued but the development of the new epithelium was arrested at the stage in which it was when the treatment began.

6. Anaphase stages of division were absent in all treated material.

7. Initial evidence from the prevalence of 16n and 8n cells in both normal and treated ilea, the absence of any appreciable increase in the diameter of the nuclei in treated specimens and the failure of the cells to initiate another division cycle after inhibition by colchicine indicate a different effect of colchicine in multiple complexes of the hind-gut of the mosquito and in plants. In the latter polyploidy is induced while in the former no polyploidy is induced but somatic reduction is prevented. This is very similar to the effect of colchicine on meiosis where meiotic reduction is inhibited but no polyploidy induced.

8. It is suggested that the failure of the colchicine to induce higher degrees of polyploidy after the division of the SA-regions in the multiple complex cells is probably due to a lack of any further duplication of the chromosomes during interphase.

9. The effect of colchicine on the metamorphosis of the ileum is dependent on the time when the treatment is applied and not on the duration of the treatment.

10. The spindle is an essential element for the completion of the metamorphosis of the hind-gut. Its inhibition by colchicine leads to a corresponding inhibition of the metamorphic process. This adds further confirmation to the theory of somatic reduction as the mechanism whereby the metamorphosis of the ileum is accomplished.

Acknowledgements.

I wish to express my sincere appreciation to Dr. C. A. BERGER for suggesting this problem, for his guidance and criticism throughout the course of the work, and for his help in the preparation of this manuscript.

From March 1950 through February 1951 the author held a Public Health Predoctoral Research Fellowship from the National Cancer Institute.

References.

- BERGER, C. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Diss. The Johns Hopkins University 1937. — Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Carnegie Institution of Washington Publ. No 496 (1938). — BUCK, J. B.: Micro-manipulation of salivary gland chromosomes. *J. Hered.* **33**, 2-10 (1942). — DERMEH, H.: A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by

extremes of temperature. J. Hered. 29, 211-229 (1938). — EIGSTI, O. J.: A cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 24, 56-63 (1938). — GEITLER, L.: Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernertheilung. Chromosoma 1, 1-22 (1939). — GRELL, S. M.: Cytological studies in *Culex*. I. Somatic reduction divisions. Genetics 31, 60-76 (1946). — HOLT, C. M.: Multiple complexes in the alimentary tract of *Culex pipiens*. J. Morph. 29, 607-618 (1917). — HURST, C. H.: The post-embryonic development of a gnat (*Culex*). Proc. a. Tr. Liverpool Biol. Soc. 4, 170-191 (1896). — LEVAN, A.: The effect of colchicine on meiosis in *Allium*. Hereditas (Lund) 25, 9-26 (1939). — LEVAN, A., u. G. ÖSTERGREN: The mechanism of c-mitotic action. Observations on the naphthalene series. Hereditas (Lund) 29, 381-443 (1943). — THOMPSON, M. T.: Alimentary canal of the mosquito. Proc. Boston Soc. Natural Hist. 32, 145-202 (1905).

From the Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

MITOTIC EFFECTS OF SODIUM NUCLEATE IN ROOT TIPS
OF *RHOEO DISCOLOR* HANCE*.

By

KLAUS PATAU and RAMAKANT P. PATIL.

With 15 figures in the text.

(Eingegangen am 10. Juli 1951.)

Introduction.

The present study is closely related to investigations on somatic reduction (HUSKINS, 1948; WILSON and CHENG, 1949; HUSKINS and CHOUINARD, 1949; PATAU, 1949; HUSKINS and CHENG, 1950) which are being continued, with the interest currently focussed on what is now called "reductional groupings." These represent "a nuclear condition showing otherwise normal mitotic chromosomes separated into two (or more) numerically equal or unequal groups. If sufficiently apart both groups may undergo anaphase separately, thus producing four nuclei with reduced chromosome sets" (PATAU, 1950). From a detailed analysis of this process in root tips of *Rhoeo* PATAU and STEINITZ (1952) conclude that reductional groupings are a means by which somatic reduction with a high degree of segregation of homologous chromosomes can be achieved, although this happens only rarely. Most reductional groupings seem to pass without lasting consequences. They occur spontaneously with a low frequency.

HERSCOFF, working with *Tradescantia* in this laboratory, has confirmed HUSKINS' (1948) finding that sodium nucleate increases the frequency of reductional groupings (to be published later). Their induced increase makes it possible to study statistically their development in time. For this purpose several experiments have been undertaken in which roots were fixed at close time-intervals before, during, and after sodium nucleate treatment. The evaluation of the results requires the frequencies of nuclei at different mitotic stages as reference values. These frequencies have already been observed to change greatly after sodium nucleate treatment. KODANI (1948) reported a strong decrease in the frequency of anaphases in treated roots of *Allium*. This was confirmed and amplified by ALLEN (1950). She found a highly significant decrease

* Program in Cytology, Department of Botany, University of Wisconsin. This Program is supported in part by grants to C. L. HUSKINS from the Research Committee of the Graduate School from funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation.

in anaphases and telophases but not in prophase or metaphases in root tips of tetraploid *Tradescantia* treated with sodium nucleate. A number of other effects of sodium nucleate have been found in *Allium* by KODANI (1948) and in *Rhoeo* by PATAU and STEINITZ (1952). The latter describe briefly: shortening of chromosomes, association and stickiness of chromosomes, disorientation of mitotic spindles, irregular anaphases and the occurrence of pyknotic masses.

A closer analysis of these effects was deemed worthwhile, especially as this could be expected to furnish a broader background for an understanding of the development of reductional groupings. For this reason the present study has been carried out with slides from a "time-series" of fixations which was primarily meant to be analyzed for reductional groupings (this is being done by Miss MARTINEZ-PICO together with the senior author).

Methods.

Eighteen *Rhoeo* plants were inserted through holes of paraffined corks which, in turn, were kept in holes of a board covering one large, opaque dish. Thus all roots were grown together in a modified Hoagland's solution (HUSKINS and STEINITZ, 1948, b) until they were transferred simultaneously into a solution of 8% sodium nucleate (from yeast, Schwarz Laboratories) in distilled water. The p_H was adjusted with NaOH to 6.0. After six hours the plants were returned to the nutrient solution¹.

The first fixation, immediately before the treatment, was denoted as 0 hr. The further 11 times of fixation can be read from Fig. 4. At each time five or, mostly, six roots from different plants (only in one case two from the same plant) were fixed in Navashin's mixture (Belling's modification for prophase stages). The root systems of all plants had been sketched and the roots numbered beforehand. Thus, both the plants and the roots to be fixed could always be selected strictly at random.

The study of the development of reductional groupings by means of a time-series of fixations requires an induced frequency increase of the groupings but not necessarily a test of the extent to which an observed increase is actually due to sodium nucleate. In view of the high sampling error of the expected small number of reductional groupings per root, it seemed best to treat all available plants rather than waste a part of them on parallel controls. For the present study the lack of parallel controls is no disadvantage in so far as the results are going to be related to the work on reductional groupings. It might, however, appear as a shortcoming in regard to the interpretation of observed effects as being caused by sodium nucleate. To have at least some kind of control, apart from the roots fixed at 0 hr, further roots fixed at 0 hr and 2½ hr were analyzed from another similar experiment. While the "main experiment" began at 11:45 a.m. (March 10, 1949) and was conducted entirely in the greenhouse, the "second experiment" started at 3 p.m. (April 2, 1949) and took place at room temperature, with plants transferred from the greenhouse the evening before. It will be seen that the results from the two experiments agree almost perfectly. This and the magnitude of the effects to be discussed should remove any doubt about their causation by the treatment.

¹ All this, and the fixation, was done by Dr. LOTTI STEINITZ to whom we are greatly indebted for her help. Because of her appointment in Columbia, Mo. she could not participate further in the study.

Since a sharp distinction between late prophase, prometaphase and metaphase was considered and proved indeed to be essential, and since, amongst other features, the spindle orientation was to be studied, sections (longitudinal; $25\ \mu$) had to be used. They were stained with Feulgen and fast green.

Most of the standards available for scoring left a considerable margin for subjective judgement. An influence of subconscious bias on the results and a conceivable, equally dangerous, shift of standards during the course of the investigation had, therefore, to be guarded against. For this reason the scoring was done (by the junior author) with coded slides, that is, without knowledge of the time of fixation of the roots under observation. The code numbers were distributed at random but, in the main experiment, in a way insuring that each of ten subsequent "runs" (of about ten slides each) covered the whole experiment more or less completely. The scoring proceeded in the sequence of the code numbers. In spite of these precautions it can not be claimed that the observations were entirely "blind," since roots fixed at later times could frequently be recognized by their general appearance. However, such recognition proved to be quite impossible for roots from about the first half of the experiment. And already for this period pronounced effects were revealed by the statistical analysis.

Correlated to the very variable root size (see Fig. 12) the number of mitoses per root is so extremely variable in *Rhoeo* that averages of absolute numbers from several roots would be too inaccurate to show any but the greatest frequency changes. Much of this variability can, of course, be eliminated by working with percentages of mitotic stages. Since it is well nigh impossible to count all cells in a large number of root tips, percentages can be computed only on the basis of all mitoses and such percentages can be very misleading. If, for instance, later stages should be prolonged, the total number of mitoses would be increased, and, consequently, the percentage of early prophases decreased even if their absolute number had not changed.

It was, therefore, desired to measure the frequencies of each mitotic stage studied in a way which would be statistically independent of the frequencies of other stages but less susceptible to differences in root size than absolute numbers. This can be achieved by dividing the observed numbers by a correction factor related to the volume of the investigated meristem tissue. In radial longitudinal sections of equal thickness the number of mitoses might be expected to be approximately proportional to the square of the root diameter if the meristem length varied proportionally to this or to the diameter itself if this and the meristem length were independent of each other. The end of the meristem is ill defined¹ but its length should be reflected by the average distance of mitoses from the root apex. Fig. 1 shows that by this criterion there is little regression of the meristem length on the root diameter and certainly no proportionality. Therefore the root diameter rather than its square should be appropriate for correcting the numbers obtained from radial longitudinal sections.

The root diameter D was measured as the cross diameter of such sections at the, arbitrarily chosen, distance 0.5 mm from the apex. This distance represents approximately the average length of the actively dividing root tip. In most roots very few mitoses are found above 0.5 mm. For a, somewhat crude, approximation it can be assumed that the average number of mitoses in tangential longitudinal

¹ It would be deceptive to judge the meristem length from whole Feulgen stained roots. Their red colour is due to the strong absorption of green light by the stained nuclei. The thicker the root the more separation of the nuclei by cell growth is required before any appreciable amount of green light can pass through a root region. With a constant meristem length the intensely red region would still be considerably longer in thick than in thin roots.

sections varies proportionally to the cross diameter of the sections at the same distance from the apex. Since the apex is not included in such sections its projection on the plane of the section had to be assessed in order to determine the distance 0.5 mm at which to measure the cross diameter. The number of rows of epidermal nuclei at the tip of a tangential section is correlated to the distance of this tip from the projected apex. The radial longitudinal section of the same root specifies this correlation, thereby permitting a sufficiently accurate estimation of that distance.

Thus for each root a "corrected number" of mitoses at a given stage could be determined by dividing the observed numbers by the sum of the cross-diameters

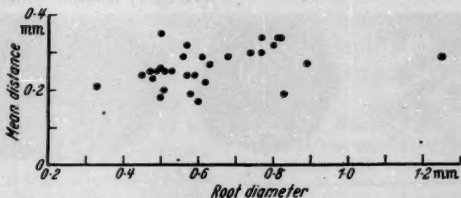


Fig. 1. Mean distance of mitoses from the apex in roots of different size.

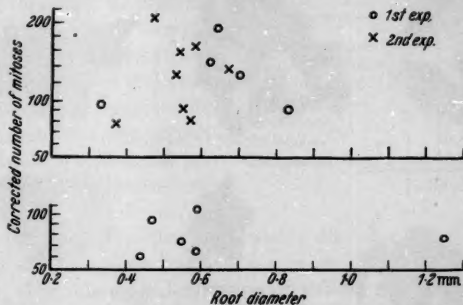


Fig. 2. Corrected number of mitoses (all stages) in roots of different size. Examples from 0 hr (top) and 5:55 (bottom, main experiment).

of all sections analyzed. These corrected numbers can be interpreted as roughly proportional to average densities of mitotic stages in the meristem. It is hardly to be expected that the corrected numbers should be entirely independent of the root size but they are greatly superior to absolute numbers by having comparable values even for roots of extremely different size (Fig. 2).

They have still another advantage. The accuracy of mean frequencies from several roots is not much improved by counting all, say 600, mitoses from a thick root if thin roots provide only totals of 80 or so each. It is not so much the sampling variance within but the variation between roots which limits the accuracy of means. The statistical efficiency may, therefore, be increased if time is gained for the analysis of more roots by not using all of the sections from thick ones. Such omissions as well as the occasional accidental loss of sections during the preparation are taken care of automatically by the computation of corrected numbers. The microscopical analysis always proceeded from the radial longitudinal sections towards the tangential ones but was broken off in thick roots when the complete score of the last section had raised the total to or above 100 mitoses.

For the statistical analysis, transformed values (square roots of corrected numbers and quotients; arc sin square root in the case of percentages) have been used freely whenever this would make the variance less dependent on the mean. Such transformations proved particularly useful for the evaluation of regressions.

Frequency changes of mitotic stages.

Nuclei at very early prophase have not been counted. The mitotic stages to be scored were defined as follows: "Early prophase" begins

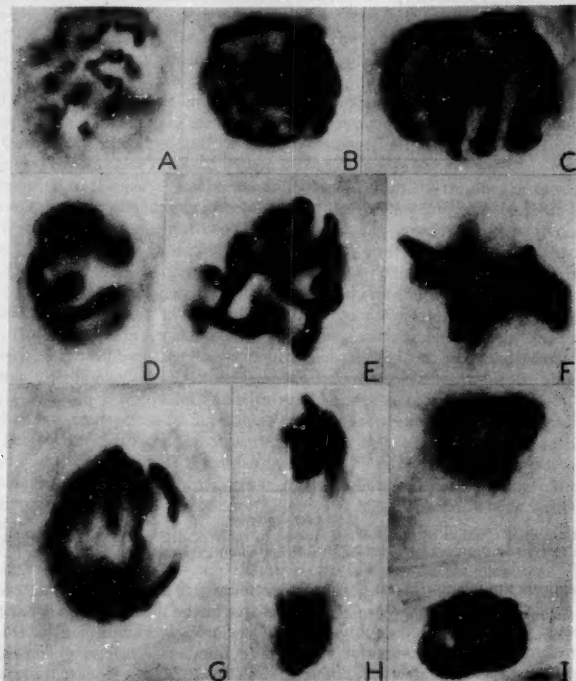


Fig. 3. Standards used for the scoring of mitotic stages: A, beginning of "early prophase;" B, — of "middle prophase;" C, — of "late prophase;" D, late prophase; E, prometaphase; F, metaphase; G, anaphase; H-I, "telophase." Fix. Navashin, 25 μ , Feulgen. $\times 2000$.

with the nuclear condition shown in Fig. 3A. The onset of "middle prophase" in Fig. 3B is marked by a certain degree of straightening out of the relic coils and enough shortening of the chromosomes to make some of their ends distinctly visible. "Late prophase" starts with the disappearance of relic coils (Fig. 3C). The contraction of the chromosomes, though higher than at middle prophase, varies considerably between

late prophase nuclei and reaches sometimes a degree beyond that found in many metaphases (Fig. 3D). "Prometaphase" is the stage between the breakdown of the nuclear membrane and the completion of a metaphase plate (Fig. 3E). "Anaphase" begins with the separation of the centromeres and passes into "telophase" when the chromosomes on each side have united into one mass (Fig. 3H). The term telophase is applied as long as the chromosomes are still distinguishable from each other as dense masses (Fig. 3I).

The total frequencies of mitoses in the untreated roots (0 hr) of both experiments are about the same (Fig. 2, top). A comparison of the relative frequencies of the different stages shows a remarkable agreement (table 1) which could hardly be expected if major changes of the mitotic rate had occurred simultaneously in the different roots of either experiment. These frequencies may, therefore, be regarded as proportional to the duration of the stages (for estimates of the absolute duration, cf. PATAU, 1952a). Even the largest difference between the two experiments in table 1, that in the late prophase frequencies, turned out (p. 492) to be not significant.

It will be shown later that roots with a diameter $D \leq 0.50$ mm differ sharply in some respects from thicker roots in their response to the treatment. The following description of sodium nucleate effects refers mainly to the thicker roots and to the main experiment. Most effects can be seen clearly in Fig. 4. Their interpretation, however, is less obvious. It requires a rather involved discussion of the relations between effects at different stages.

First, there is a marked and clearly significant decrease in the frequency of nuclei at early prophase during the treatment, a decrease which also exists in the thin roots. In the second experiment the corrected numbers of early prophase nuclei decrease significantly already within the first $2\frac{1}{2}$ hours. This is shown best by using the indicated regression of these numbers on the root diameter (Fig. 5, table 2). The decrease could, *a priori*, mean that fewer nuclei enter early prophase per time unit or that this stage is accelerated. In view of the fact that unmistakable signs of, often severe, damage both to resting nuclei and prophases appear more and more frequently during the later period of the treatment, the first interpretation seems very plausible. Other evidence for

Table 1. Relative frequencies of mitotic stages in untreated roots; percentages computed from mean corrected numbers at 0 hr.

	Main experiment 5 roots	Second experiment 8 roots
Early prophase .	22.0	20.5
Middle prophase.	22.9	23.9
Late prophase. .	8.3	15.3
Prometaphase. .	3.0	3.8
Metaphase . . .	15.8	13.8
Anaphase. . . .	10.8	9.7
Telophase. . . .	17.2	13.1
	100.0	100.1

it will be given below. There is nothing to recommend the second interpretation.

The decrease in the frequency of early prophase nuclei could, *a priori*, also be explained by a return of some of these into the resting stage. WADA (1944) who observed *in vivo* the mitosis in staminal hairs of

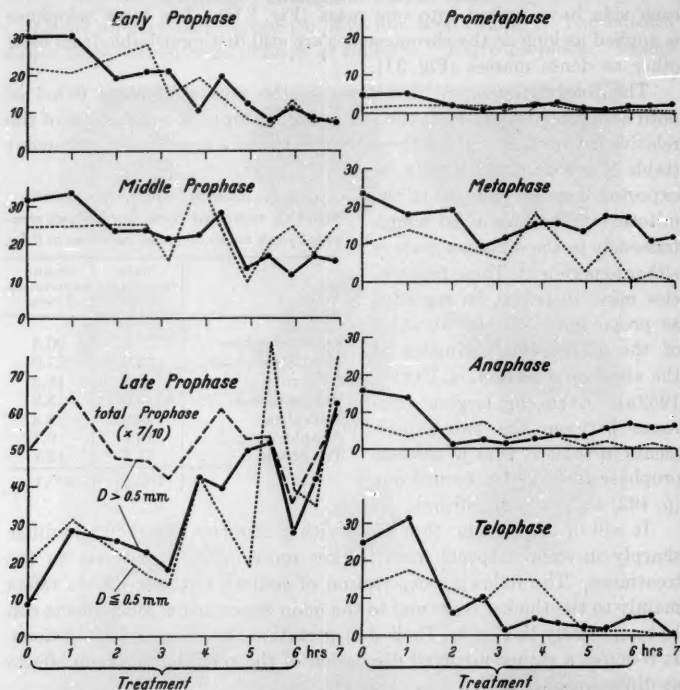


Fig. 4. Means of corrected numbers of mitotic stages (ordinates) at different times (abscissae) given separately for roots with a diameter $D > 0.50$ mm (thick line) and $D \leq 0.50$ mm (dotted line). Main experiment.

Tradescantia has reported such a return to occur under the influence of strong illumination. If a similar return had happened to early prophase nuclei in the present experiment the decrease in the frequency of middle prophase nuclei might be expected to be larger than that of earlier ones. This is not the case.

A very striking effect of sodium nucleate is a large increase in the number of late prophase nuclei¹. This more or less compensates for

¹ The short interval fluctuations in the late prophase curve of Fig. 4 will be shown elsewhere to be entirely within the random range (PATAU, 1952a).

a decrease of earlier stages. If merely "prophases" had been scored without distinguishing "late" from "early" and "middle," both effects could easily have been missed. The increase in the frequency of late prophases must be due to a prolongation of this stage and not merely (probably not at all) to an increased influx. This can most conclusively be demonstrated by using the quotient, per root, of the frequencies (prometaphase/late prophase). This quotient should eliminate some of the variability among roots and it lends itself to a simple interpretation. The time lag introduced by the duration of prometaphase is clearly negligible. The quotient, at any time t , can therefore be regarded as proportional

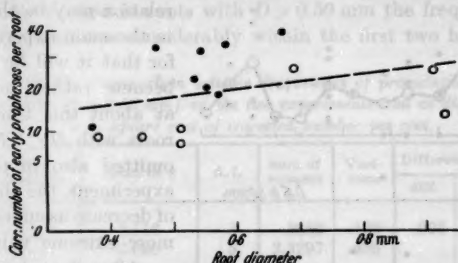


Fig. 5. Decrease of early prophase nuclei from 0 hr (dots) to $2\frac{1}{2}$ hrs (circles). Scale of ordinate: square roots. Broken line: common regression on root diameter. Second experiment.

both to the duration of prometaphase and to the rate of transition into prometaphase, in other words to the probability ΔP that a late prophase nucleus, chosen at random, will start passing into prometaphase within the interval t to $t + \Delta t$.

Table 2. Decrease in the frequency of early prophase nuclei during the first $2\frac{1}{2}$ hours—second experiment. Analysis of covariance based on the square-roots of the corrected numbers.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square
Deviations from common regression	13	18.078	
Within time groups	12	8.833	.7361
Between adjusted means	1	9.245	9.245

$$F = 12.56; \sqrt{F} = t_{12} = 3.54; P = .004 \text{ (} P \text{ taken from } t \text{ table of PATAU, 1943).}$$

Fig. 6 ($D > 0.50$ mm) shows that the quotient drops sharply within the first two hours. The negative regression of its square root on time between 0 and 2 hrs renders $t_0 = 4.5$; $P = 0.0015^1$. This regression

¹ Here and later the statistical test of a regression refers, of course, always to the difference of its coefficient from 0.

amounts to a drop of the quotient itself by the factor $1/12.7$. The early decrease of the quotient (prometaphase/late prophase) is also found in the second experiment. Here the difference between means of the square roots of the quotient at 0 and $2\frac{1}{2}$ hrs is even more significant ($t_{13} = 4.9$; $P = 0.0003$). The decrease of the quotient itself is by the factor $1/8.4$, in satisfactory agreement with $1/12.7$ from the main experiment. The t_{13} is computed from both thick and thin roots as the one fixation at

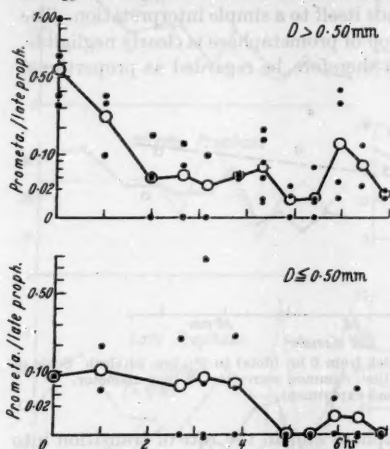


Fig. 6. Ordinate (scale: square roots): frequency quotient (prometa./late proph.), interpreted as rate of transition from late prophase to prometaphase. Abscissa: time of fixation. Dots: values per root; circles: means computed from square roots. Main experiment.

appearance of prometaphase nuclei from 4:55 hrs on (Fig. 6). This effect in thin roots may, however, be of a different nature and will, therefore, not be used in the present argument.

If the rate of transition from prophase to prometaphase had remained unchanged, the above data would mean that the duration of the prometaphase has been shortened to about one tenth of its value in untreated roots. This appears utterly unlikely. Consequently a large reduction of the rate of transition into prometaphase must be assumed. If the increase in the frequency of late prophase nuclei were due to an increasing influx, some reduction of the rate of transition would, of course, be expected as there would be a higher percentage of "younger" late prophase nuclei. But this could only be a small reduction, because of the smallness of the average increase in the frequency of late prophase nuclei within any plausible normal duration of this stage (less

$2\frac{1}{2}$ hrs is not sufficient to establish a relation between the quotient and D . The relation may be the same as in the main experiment and for that it will be shown to become rather complicated at about this time. If the roots with $D \leq 0.50 \text{ mm}$ are omitted also in the second experiment, the above factor of decrease assumes the even more extreme value $1/14.4$.

After two hours (main experiment) the quotient shows, on the average, no further major changes in roots with $D > 0.50 \text{ mm}$. In roots with $D \leq 0.50 \text{ mm}$, however, a sudden drop occurs after 4 hrs leading to an almost complete dis-

than two hours: PATAU, 1952a) (cf. Fig. 4). The reduction of the rate of transition must mainly be due to a very considerable increasing prolongation of the late prophase.

The decrease in the rate of transition from prophase to prometaphase is accompanied by a large increase in the number of late prophase nuclei and does, therefore, not necessarily imply that the absolute (corrected) number of nuclei leaving prophase per time unit, in other words the "prometaphase influx," decreases. For a further analysis of the established prolongation of the late prophase this influx has to be checked.

Fig. 4 shows that in roots with $D > 0.50$ mm the frequency of prometaphases decreases considerably within the first two hours with, on

Table 3. Comparison between frequencies of prometaphases (in roots with $D > 0.50$ mm) in the two experiments and at different times.
 x = square root of corrected number per root.

Time	Ex-periment	Mean of x	d. f.	Sum of squares	Vari-ance	Difference between means		
						diff.	t	P
0 hr	1st	2.116	3	.3859	.129	.096	.26	.80
	2nd	2.020	5	2.3297	.466			
2-6:55	1st	1.083	32	12.2229	.382	.411	1.35	.18
	2nd	.672	4	2.2407	.560			
0 hr	1st + 2nd	$\bar{x}_1 = 2.058$	9	2.7381	.304	1.029	4.64	<.0002
2-6:55	1st + 2nd	$\bar{x}_2 = 1.029$	37	15.1949	.411			

the average, little change thereafter. A similar decrease from 0 to 2½ hrs appears in the second experiment. A comparison between the two experiments, done separately for 0 hr and for the pooled values of all times from 2 hrs on, does not reveal any significant differences in means or variances. The values from the two experiments can, therefore, be pooled within each time group (table 3). The difference between the mean square roots \bar{x}_1 and \bar{x}_2 of the corrected numbers at 0 hr and from 2 to 6:55 hrs is highly significant. It corresponds to a decrease in the frequency of prometaphases within the first two hours by a factor $1/q$ with $q = (\bar{x}_1/\bar{x}_2)^2 = 4.0$. Such a reduction appears again too large to be explained by a corresponding shortening of the duration of this stage. However, the true value of q may be smaller than 4. A lower fiducial limit for q is required.

The significance of the deviation of the ratio of two observed means from a hypothetical ratio (in our case \sqrt{q}) can be judged by an extension of the t -test (PATAU, 1952c). Applied to the present data the formula renders:

$$t_{46} = (2.058 - 1.029 \sqrt{q}) / \sqrt{\frac{15.1949 + 2.7381}{46} \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{38} q^2 \right)}.$$

The probability of obtaining by chance an as large or larger positive t would be $P=0.05$ if $t_{46}=1.678$ (corresponding to $P=0.1$ in a t -table which covers both positive and negative deviations; the latter are of no interest as $q > 4$ would be even more favourable to our argument). From this the lower fiducial limit $q = 2.51$ is obtained.

Even a decrease in the frequency of prometaphases by "only" $1/2.5$ appears, at least to us, still as too large to be plausibly explained by a hypothetical acceleration of this stage. Such an acceleration need hardly be considered any further. It does not seem likely in the first place in view of the fact, to be pointed out later, that this study has not revealed any signs of a stimulating effect of the treatment on a normal process. It is, therefore, concluded that it is the prometaphase influx which has been reduced by at least $1/2.5$ during the first two hours or so. This, in conjunction with the more or less constant total frequency of prophase nuclei (Fig. 4), means that the total duration of prophase has been prolonged. It means further a decrease in the frequency of nuclei entering early prophase. This decrease had already been accepted as the most plausible interpretation of the early prophase curve.

A prolongation of prophase as a whole does, of course, in no way imply any slowing down before late prophase. But it does contradict an otherwise possible interpretation of the approximate constancy of the total prophase frequency: The accumulation of late prophase nuclei cannot be due, at least not exclusively, to a specific treatment effect of the following kind: it would in the earlier stages of prophase accelerate the straightening out of the chromosomes (by which the onset of late prophase had been defined) but not interfere with other processes determining the duration of prophase.

Of such processes the breakdown of the nuclear membrane is one. But this happens only after the nucleus has achieved a sufficient "maturity" by other processes which may include more than just the visible development of the chromosomes. However, only this is available here as a criterion for the "maturity" of a prophase nucleus. It will be seen below that late prophase nuclei, judged by their degree of chromosome contraction, are on the average much more advanced in treated than in untreated roots. The excess of late prophases seems to be due to nuclei which, by their appearance, might be expected to pass into prometaphase at any moment. The most obvious interpretation is certainly an inhibition of the breakdown of the nuclear membrane. There is nothing to indicate (or to contradict) a slowing down of the previous nuclear development.

The changes in the frequencies of the later mitotic stages during the first period of the treatment are best described on the basis of the second experiment which has the largest samples per time of fixation

(0 and $2\frac{1}{2}$ hrs). The evaluation of these data, though, met with the following complication. There is, at $2\frac{1}{2}$ hrs an apparently steady regression on root size (Fig. 7). The $2\frac{1}{2}$ hrs sample happens to include two large roots while the 0 hr sample has only small and medium roots. This in conjunction with the strong regression makes it inadvisable to

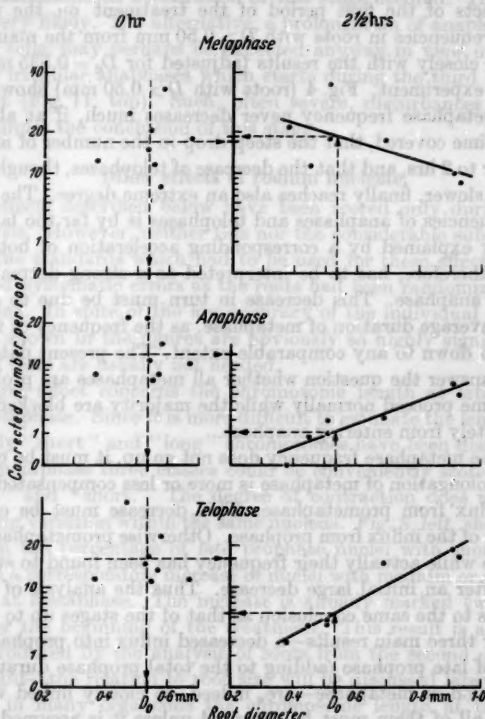


Fig. 7. Corrected numbers of metaphases, anaphases, and telophases (scale of ordinates: square roots) in roots of different size at 0 hr and $2\frac{1}{2}$ hrs. Second experiment.

compare with each other the means at 0 and at $2\frac{1}{2}$ hrs as could be done above with prometaphases which show no such regression.

The appropriate procedure for each of the three last stages is this: At 0 hr the mean square root of the corrected numbers may or may not be representative for all root sizes, it certainly is (within the limits imposed by the sampling error) representative for the mean $D_0 = 0.535$ mm of the root diameters in this sample. At $2\frac{1}{2}$ hrs the regression is used to estimate the mean square root adjusted to the same D_0 (the computation

is indicated by arrows in Fig. 7). The results are clear enough not to require tests of significance: there is, after $2\frac{1}{2}$ hrs, no significant change of the metaphase frequency, but both the anaphase and telophase corrected numbers have been greatly reduced, the first to about 1/12, the second to 1/3 of the values in untreated roots.

The effects of the first period of the treatment on the meta- to telophase frequencies in roots with $D > 0.50$ mm from the main experiment agree closely with the results (adjusted for $D_0 = 0.535$ mm) from the second experiment. Fig. 4 (roots with $D > 0.50$ mm) shows further that the metaphase frequency never decreases much, if at all, during the whole time covered, that the steep drop in the number of anaphases occurs prior to 2 hrs, and that the decrease of telophases, though initially apparently slower, finally reaches also an extreme degree. The decrease in the frequencies of anaphases and telophases is by far too large to be conceivably explained by a corresponding acceleration of both stages. The drop, therefore, has to be interpreted as a strong decrease of the influx into anaphase. This decrease in turn must be due to a greatly prolonged average duration of metaphase, as the frequency of this stage does not go down to any comparable extent. The present data do not, of course, answer the question whether all metaphases are prolonged or whether some proceed normally while the majority are blocked more or less completely from entering anaphase.

Since the metaphase frequency does not go up, it must be concluded that the prolongation of metaphase is more or less compensated by a decreased influx from prometaphase. This decrease must be caused by a reduction of the influx from prophase. Otherwise prometaphases would accumulate while actually their frequency has been found to stay about constant after an initial large decrease. Thus the analysis of the later stages leads to the same conclusion as that of the stages up to prometaphase. Our three main results—a decreased influx into prophase, a prolongation of late prophase (adding to the total prophase duration), and a prolongation of metaphase—are, indeed, so closely linked with each other that all of them must be accepted unless it is assumed that the treatment causes prometaphase and anaphase and telophase to be extremely accelerated. Such an interpretation of the data, especially in view of the very different processes going on in these stages, would surely be all but absurd.

The sharp drop in the frequency of anaphases and, consequently, that of telophases is the combined result of a prolongation of late prophase and of metaphase. But the treatment also seems to cause a prolongation of the anaphase itself. Its frequency shows, after the initial fall, a slow but significant rise (the positive regression on time of the square roots of the corrected numbers from all roots with $L > 0.50$ mm

from 2 hrs onwards renders $t_{21}=3.7$; $P=0.009$) which does not seem to be followed by a correspondingly increased frequency of telophases. If the increase in the frequency of anaphases were to be explained by a higher influx from metaphase, the telophase frequency should soon follow unless a simultaneous acceleration of this stage occurred. This does not appear very likely. The alternative, a prolongation of anaphase at least in many cells, may perhaps be expected anyway in view of a vast increase of irregular anaphases which starts during the third hour of the treatment (Fig. 11, top). Such, often severe, disturbances can hardly fail to hamper the conclusion of this stage.

Other effects of sodium nucleate.

The effects described below have been scored only during part of the analysis. However, neither this nor the considerable subjectivity of some of the standards which had to be used for these effects can have introduced systematic errors as the roots had been randomized and the slides coded. In spite of the low accuracy of the individual values, the effects as shown in the figures are obviously so highly significant that statistical tests are usually not needed.

The first effect concerns the chromosome length at late prophase and at metaphase. Since it is more difficult to estimate the length at prophase, only "short" and "long" chromosomes have been distinguished, while at metaphase three classes could be conveniently scored: "long," "medium" and "short." The degree of contraction does not display any striking variation within the same nucleus. Fig. 8, left, shows a large increase in the percentage of late prophase nuclei with short chromosomes and a corresponding increase of nuclei with medium or short chromosomes at metaphase. The increase is already marked two or three hours after the beginning of the treatment. This result is almost perfectly reproduced by the analysis of roots from the second experiment (Fig. 8, right—the relation to root size will be discussed later).

While in many organisms the chromosome length at the mitotic metaphase is almost constant this is not so even in untreated *Rhoeo* roots. Possibly the shortening of the chromosomes at prophase never ceases until its potential maximum has been reached. In *Rhoeo* roots this might normally not happen because of a too early termination of prophase (whether the chromosome contraction still proceeds after prophase is unknown). If this is correct, the greatly extended duration of late prophase in treated roots would fully explain the correlated increase in the frequencies of nuclei with short chromosomes at late prophase and at metaphase. The implied independence of the breakdown of the nuclear membrane and the chromosome shortening has already been postulated by MARQUARDT (1938).

If the above explanation of the induced excessive chromosome contraction is correct, it would follow that also in untreated roots there should be a positive regression of the degree of chromosome contraction at late prophase and at metaphase on the duration of late prophase as indicated by the relative frequency of late prophase nuclei. This expectation is borne out by the pooled data from both experiments at 0 hr (Fig. 9, top): the positive regression at metaphase renders $t_{10} = 2.98$,

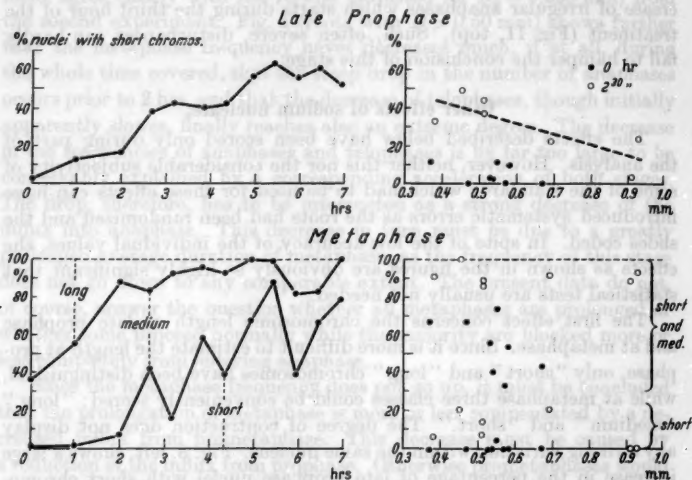


Fig. 8. Percentage of nuclei with short (medium and long) chromosomes. Left: computed from pooled data per time of fixation, main experiment. Right: in roots of different size, second experiment.

and $P = 0.014$, that at late prophase $t_{10} = 2.63$, and $P = 0.025$. This predicted regression in untreated roots is particularly noteworthy as it is not displayed by an otherwise statistically rather similar feature to which the above argument does not apply: The disorientation of metaphase spindles, to be discussed subsequently, has about the same formal relation to the duration of the treatment and to the root diameter as does the chromosome contraction (cf. Fig. 8 and 10) but it does not show a positive regression on the duration of late prophase in untreated roots (Fig. 9, bottom).

A large increase of the disorientation of otherwise apparently normal, bipolar, metaphase spindles after sodium nucleate treatment has already been observed by PATAU and STEINITZ (1952). In untreated roots most of these spindles are approximately parallel to the periclinal cell walls and within a plane containing the root axis. Fig. 10, left, shows that

after about three hours of treatment a more or less random orientation of the spindles is reached. Since the deviations from the typical orientation were only estimated, it cannot be said whether the orientation during the later period of the treatment is entirely at random in small and medium sized roots. It certainly is not in large roots, as in these the degree of disorientation will be shown to have a negative regression on the root diameter. The data of the second experiment are again in excellent agreement with those from the first (Fig. 10—the relation to the root size will be discussed later).

Disorientation of mitotic spindles has already been observed after radiation (MARQUARDT, 1938) and after treatment with low concentrations of agents which in stronger concentration induce the more severe forms of spindle disturbance (GAVAUDAN, 1943; ÖSTERGREN, 1950). The latter are also produced by sodium nucleate (KODANI, 1948; PATAU and

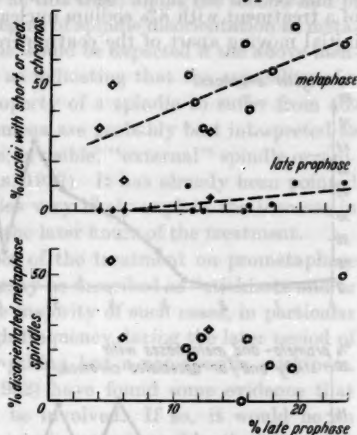


Fig. 9. Top: regression of chromosome shortening on frequency (interpreted as proportional to duration) of late prophase. Bottom: absence of corresponding regression of spindles with oblique or perpendicular orientation to root axis. Untreated roots (diamonds: main experiment; circles: second experiment).

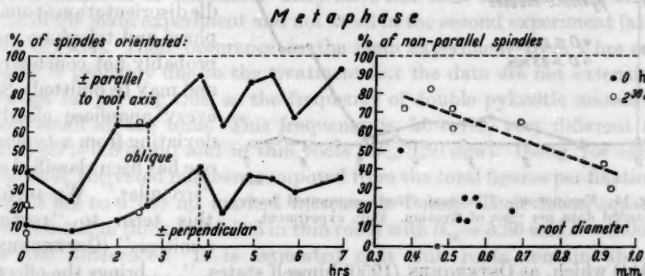
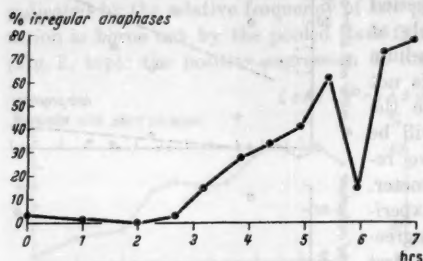


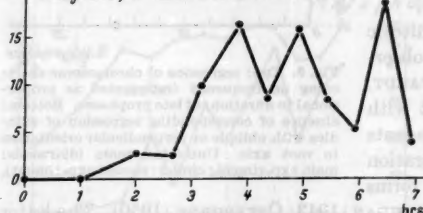
Fig. 10. Orientation of metaphase spindles. Left: computed from pooled data per time of fixation, main experiment. Right: in roots of different size, second experiment.

STEINITZ, 1952). At anaphase they display a very diverse pattern of irregularities such as discontinuous and incompact spindles, over-elongated spindles, belated separation of some chromosomes, wide scattering of chromosomes. Evidence of a complete inhibition of the spindle,

however, has been found only very rarely in *Rhodo*, either in this or in other experiments (still in progress) covering a long period after the end of a treatment with 8% sodium nucleate. Practically always at least an initial moving apart of the centromeres is indicated. The absence of a



% prometa- and metaphases with sticky and/or associated chromos.



corrected numbers of single pyknotic masses

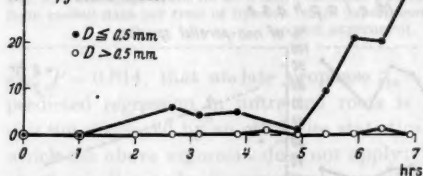


Fig. 11. Frequencies of several effects, computed from pooled data per time of fixation. Main experiment.

full colchicine effect after the present strong treatment is the more noteworthy as *Rhodo* reacts quite typically to colchicine (HUSKINS and STEINITZ, 1948a). In the root tips of *Allium*, however, the colchicine effect has been described as occurring with an appreciable frequency after sodium nucleate treatment (KODANI, 1948).

It has not been attempted to score separately the different manifestations of a faulty functioning of the spindle mechanism, other than a mere disorientation. (Our data on spindle disorientation at anaphase and telophase are probably not conclusive and may be omitted). So every anaphase clearly deviating from a typical one has been classified as "irregular." We prefer this term to "partial c-mitosis" (ÖSTERGREN,

1944) which, as ÖSTERGREN (1950) himself states, "... brings the effects in too close a connection to colchicine, which is not good in the case of effects provoked by such a multitude of diverse influences."

The question whether it is advisable to use ill defined standards, such as the "irregularity" of anaphases, for quantitative work will be taken up in the discussion. Fig. 11, top, shows at any rate that it was justified in the present case. Only thus was it possible to determine the

time at which irregular anaphases start to appear in a rapidly increasing frequency. It is noteworthy that at this time, about the second half of the third hour of treatment, the degree of spindle disorientation at metaphase is already considerable. This would be expected if the above mentioned observations are regarded as indicating that the capability of a correct orientation is the first property of a spindle to suffer from adverse conditions. All these phenomena are probably best interpreted as caused by an interference with the, invisible, "external" spindle organizers (cf. DARLINGTON and THOMAS, 1937). It has already been pointed out that the anaphase irregularities very likely explain the increase in the frequency of this stage during the later hours of the treatment.

Fig. 11, middle, shows an effect of the treatment on prometaphase and metaphase chromosomes that may be described as "stickiness and/or association of chromosomes." The majority of such cases, in particular of those which account for the high frequency during the later period of the treatment, suggest hardly anything but a non-specific stickiness. However, PATAU and STEINITZ (1952) have found some evidence that homologous association may also be involved. If so, it would be an entirely open question whether this is or is not increased by the treatment.

The last effect to be described is the occurrence of pyknotic masses, i.e., intensely Feulgen-positive bodies of a size which leaves no doubt that they are degenerated nuclei. There may be a single pyknotic mass or two pyknotic masses within one cell. The two types must be considered separately.

Two pyknotic masses within one cell are most likely derived from either anaphase or telophase. They have not been observed at 0 or at 1 hr in the main experiment and not at all in the second experiment (at 0 and 2½ hrs). Their occurrence in the main experiment from 2 hrs onwards is probably due to the treatment but the data are not extensive enough for proving this, as the frequency of double pyknotic masses is very small all the time. This frequency is, however, very different in thick ($D > 0.50$ mm) and in thin roots ($D \leq 0.50$ mm). Using, for each size class, corrected numbers computed from the total figures per fixation from 2 hrs to 6:55, no marked increase is found. Their mean square root is 0.192 in thick and 0.906 in thin roots with ($t_{16} = 3.56$ and $P = 0.003$ for the difference). It is estimated that thin roots contain about $22 = (.906/.192)^2$ times as many double pyknotic masses as thick roots.

The single pyknotic masses (Fig. 11, bottom) present an entirely different picture. With very few exceptions, they are not found at all in roots with $D > 0.50$ mm while they occur with an appreciable frequency in thinner roots between 2 and 5 hrs and then increase sharply up to a corrected number of about 30. This steep rise takes place about simultaneously with the almost complete disappearance of prometaphase

nuclei in these thin roots. Possibly the single pyknotic bodies are degenerated late prophase nuclei.

It may be mentioned that sodium nucleate does not induce chromosome breaks with any noticeable frequency in *Rhoeo*, for neither fragments nor convincing cases of bridges have been found so far (except the one break at the centromere mentioned by PATAU and STEINITZ, 1952).

Relations between root size and effects of the treatment.

The extent to which the size of the roots can influence their susceptibility to the treatment had not been anticipated. It had been deemed sufficient to prevent any influences that might exist from producing systematic errors. Consequently the roots to be fixed were chosen entirely at random. This, of course, did not provide within most fixations that maximal variation of the root diameter which an analysis of regressions on root size would call for. At least a preliminary study of this kind seemed, however, desirable when such regressions were found to cause much of the variation of effects in roots exposed to the same treatment, in other words when the root size was found to be a factor of major concern for the design and evaluation of experiments with roots of *Rhoeo*.

The number of mitoses increases, of course, with the number of cells and, therefore, with the root size. It cannot be expected that this regression is entirely eliminated by the computation of corrected numbers. For proving physiological effects of the root size, quotients of some kind have to be used wherever possible. If the variation of D in the few roots fixed at one time is small only those quantitative features are likely to reveal a regression on root size which have a fairly small sampling error. For mitotic frequencies this error becomes relatively smaller as more stages are pooled. For this reason the total percentage of nuclei at any of the stages from prometaphase to telophase was computed for each root (Fig. 12).

Such over-all frequencies are, of course, apt to cause those treatment effects which influence the frequencies of different stages in opposite direction to cancel each other. This explains why in Fig. 12 the roots with $D > 0.50$ mm at 5:55 do not display any regression on D , although a more detailed analysis (table 4) shows all individual treatment effects much less pronounced in the very thick root than in the medium sized ones. On the other hand the prometa- to telophase percentage does reveal some features more clearly than the less accurate values taken from individual stages. A close comparison shows that changes (in time or with root size) of that percentage are largely determined by changes in the rate of transition from prophase into prometaphase.

The available evidence on relations between root size and treatment effects is, for the given reasons, fragmentary. The data do suffice, though,

to establish the occurrence of at least three different types of regression curves which will be distinguished as (a), (b), and (c). This distinction is descriptive in a purely formal sense and does not imply basic differences, although these cannot be excluded either. Types (a) and (b) are clearly related: (b) follows in time on (a), both appear at late prophase and possibly primarily only at this, and both mark with an amazing precision the root diameter $D=0.50$ mm as a critical value. Probably this

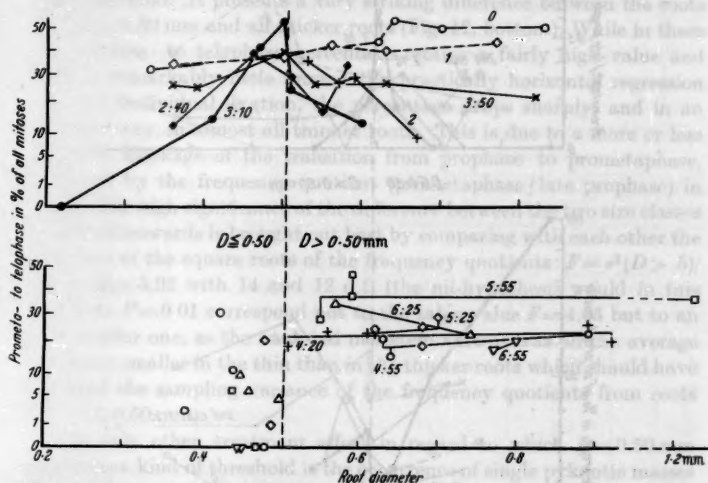


Fig. 12. Percentage of all stages later than prophase (scale of ordinates: arc sin $\sqrt{\%}$). Time from beginning of treatment to fixation inscribed (top: 0 hr to 3:50; bottom: 4:20 to 6:55). All roots from main experiment.

precision has been somewhat enhanced by chance but there can be no doubt that this critical value has a low variability indeed.

The relation (a) can be seen in Fig. 12, top, at 2:40, 3:10, and 3:50. In all cases the prometa- to telophase percentage has its maximum (highest at 3:10) in the largest root with $D \leq 0.50$ mm. The continuous drop to the left is obviously significant. Even when the very thin root is omitted because of its very poor condition (it has one late prophase as its only mitosis) the regression coefficient of the arc sin square root of the percentages from the remaining five roots at 2:40 and 3:10 with $D \leq 0.50$ mm, still renders $t_3 = 6.06$; $P = 0.009$. The drop of the regression curves to the right of the maximum is less extended but proves nevertheless highly significant when the mean of the transformed percentages from the four roots within the range of the maximum ($0.46 \leq D \leq 0.50$ mm) is compared with that from the eight roots with $D \geq 0.51$ mm:

$t_{10}=4.40$; $P=0.0014$. The decline of the percentage with increasing D seems to exist already at 2 hrs: the four roots indicate, in spite of their limited range of D , a noticeable negative regression of the arc sin square root: $t_2=5.64$; $P=0.03$.

The maximum of the prometa- to telophase percentages at or slightly below $D=0.50$ mm is apparently caused entirely by the relatively very

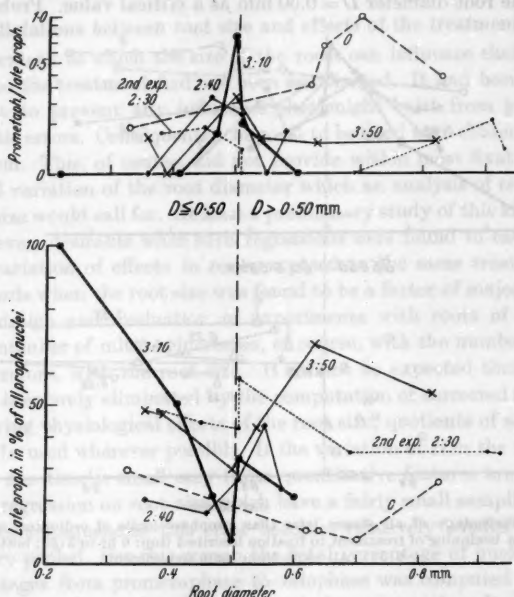


Fig. 13. Different rate of transition from prophase to prometaphase (see text) in roots of different size from 2:40 to 3:50. Main experiment, except seven roots from second experiment at 2:30.

high maximum of the rate of transition from prophase to prometaphase in these roots. The frequency quotient (prometaphase/late prophase) (Fig. 13, top) shows practically the same relation to D as does the percentage in Fig. 12, top. The drop of this quotient on both sides of its maximum is so steep that it can be explained only by a corresponding sharp decrease of the influx into prometaphase. This, of course, should become apparent also in a comparatively low late prophase frequency at and slightly below $D=0.50$ mm and in an accumulation of this stage both in thinner and in thicker roots. This, indeed, is the case (Fig. 13, bottom; the percentage is based only on prophases in order to render it independent of whatever may happen after prophase).

The result from the main experiment can thus be summarized: In the period around 3 hrs there is no appreciable prolongation and possibly even a shortening of the duration of the late prophase in roots with a diameter equal to or slightly below 0.50 mm, while both in thinner and in thicker roots a considerable prolongation takes place. The 2:30-curves from the second experiment in Fig. 13 perhaps indicate a similar relation.

The type (b) of relation between effect and D develops between 3:50 and 4:55. It presents a very striking difference between the roots with $D \leq 0.50$ mm and all thicker roots (Fig. 12, bottom). While in these the prometa- to telophase percentage retains a fairly high value and scatters remarkably little around the practically horizontal regression lines per individual fixation, the percentage drops sharply, and in an irregular way, in almost all thinner roots. This is due to a more or less complete blockage of the transition from prophase to prometaphase, as shown by the frequency quotient (prometaphase/late prophase) in Fig. 6. The high significance of the difference between the two size classes from 4:55 onwards is brought out best by comparing with each other the variances of the square roots of the frequency quotients: $F = s^2(D > .5) / s^2(D \leq .5) = 5.92$ with 14 and 12 d.f. (the nil-hypothesis would in this case have $P = 0.01$ correspond not to the table value $F = 4.05$ but to an even smaller one, as the analyzed meristem volume was on the average somewhat smaller in the thin than in the thicker roots which should have increased the sampling variance of the frequency quotients from roots with $D \leq 0.50$ mm).

The only other treatment effect in regard to which $D = 0.50$ mm appears as a kind of threshold is the occurrence of single pyknotic masses (Fig. 11, bottom) but it has already been pointed out that these could conceivably be the result of degeneration of the blocked prophase. A large difference between thin and thick roots has also been demonstrated above for double pyknotic masses but their numbers are too small for distinguishing between a continuous regression and a sudden increase at $D = 0.50$ mm.

Type (c) appears as a simple regression on D and over a wide range of D without the sudden changes characteristic for (a) and (b). For quantities which can be increased by the treatment this regression, when present, seems in general to be negative. It already occurs in untreated roots. The percentage of late prophase nuclei and therefore, presumably, the duration of this stage shows a negative regression on D at 0 hr in both experiments (Fig. 14). The common regression might be subject to statistical bias, so both samples are best tested separately.

The data from the second experiment indicate a straight regression ($t_0 = 3.33$ and $P = 0.016$). In the main experiment the late prophase percentage increases significantly from its mean 4.9% in the three medium

sized roots to 12.8% in the root with $D = .83$ mm: $t_2 = 6.8$; $P = 0.021$. The relation of this increase to D , however, could be a pure coincidence between the large root size and whatever "accident" caused the percentage to go up. This possibility renders $P = 0.11$ (PATAU, 1952b,

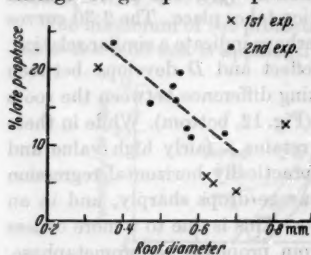


Fig. 14. Regression of frequency (interpreted as proportional to duration) of late prophase on root size in untreated roots from both experiments. Broken line: regression in roots of second experiment only.

table 4). It seems safest to pool these four values for a comparison with the percentage in the thin root: $t_3 = 3.98$; $P = 0.029$. Again the possibility of a mere coincidence with the root size has to be tested: $P = 0.035$ (l.c.). This sufficiently supports the evidence from the second experiment to regard a negative regression of the late prophase frequency on D (in its medium range) as established for untreated roots. Fig. 14, shows, incidentally, that the difference in this percentage between the two ex-

periments (table 1) practically disappears when, by this regression, allowance is made for the different root sizes in the two samples.

Apart from an indicated correlation between chromosome contraction and D (Fig. 8, bottom, right) which is to be expected in view of the

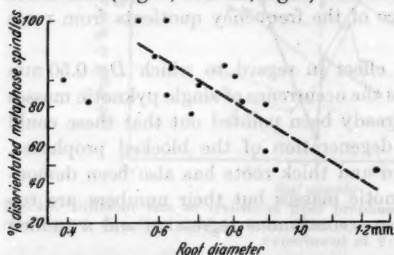


Fig. 15. Regression of spindle disorientation on root size. Main experiment, 3:50 to 6:55, all roots in which 11 or more spindles had been scored. Scale of ordinate: arc sin $\sqrt{\%}$.

two regressions of Fig. 9 and 14, there is no further evidence of a relation between mitotic features and D in untreated roots.

The second experiment provides, at $2\frac{1}{2}$ hrs, several instances of such relations in treated roots. The frequency of anaphases and that of telophases both show strong regressions on D which become even more

pronounced when related to the metaphase frequency (the regression on D of the square root of the frequency quotient (ana. + telo./meta.) renders $t_5 = 9.96$; $P < 0.0002$). In the same roots both the induced chromosome contraction (Fig. 8, top right) and the disorientation of the metaphase spindles (Fig. 10, right) display a negative regression on D with $t_5 = 3.00$ and $P = 0.03$ in the first, $t_5 = 3.24$ and $P = 0.023$ in the second case.

In general, once the roots with $D \leq 0.50$ mm have begun to show the strikingly different behavior described under (a) and (b), neither the

number of remaining roots per sample nor the range of D is sufficient to reveal moderate regressions of treatment effects on D . However, in the case of the induced disorientation of metaphase spindles the data from 3:50 onwards can be pooled, as there is no indication of further changes (Fig. 10, left). Thus a negative regression of this effect on D can be demonstrated for roots with $D > 0.50$ mm (Fig. 15; $t_{13} = 5.15$; $P = 0.0002$).

Further evidence of the dependency of treatment effects on D is furnished by the outstandingly large root at 5:55. The three medium sized roots from the same fixation show all effects previously described, with the exception of single and double pyknotic bodies which do not occur in the very thick root either. All of those effects are, if present at all, much less developed in the latter than in the medium-sized roots (table 4). This could, of course, be due to an unknown factor entirely

Table 4. *Effects of the treatment on eight mitotic features at 5:50 (main experiment) in a very thick and in three medium sized roots. The effects are shown by the decrease or increase of the value A during 5 hrs 55 min. of treatment.*

Effect of treatment	A	A at time		
		0 hr	5:55	
		4 roots $0.62 \leq D \leq 0.83$ mm	1 root $D = 1.25$ mm	3 roots $0.55 \leq D \leq 0.59$ mm
Smaller influx into early prophase. . .	M (early pro.)*	30.6	24.5	6.8
Prolongation of late prophase	M (late pro.)*	1.9	2.4	30.8
	M (prometa.)			
Prolongation of metaphase.	M (meta.)*	5.1	5.1	16.8
	M (prometa.)			
Prolongation of anaphase.	M (ana.)*	0.64	0.70	2.13
	M (telo.)			
Chromosome shortening at:				
late prophase . .	% nuclei with short chromosomes	2.3	9.7	60.2
metaphase . . .	% nuclei with short or med. chromosomes	36.2	63.5	92.7
	% nuclei with short chromosomes	1.4	0.0	61.5
Spindle disorientation at metaphase	% spindles oblique or perpendicular to root axis	37.8	46.3	84.6
	% spindles perpendicular to root axis	10.8	24.4	30.8
Irregular anaphases .	%	2.0	3.6	30.8
Associated and/or sticky chromosomes at pro-metaphase and metaphase	%	0.0	0.9	8.3

* M(—): mean corrected number of nuclei at—.

unrelated to D . However, the very thick root is distinguished not only from the three other roots at 5:55 by its small response to the treatment, but from all 21 roots with $0.50 < D \leq 0.92$ mm fixed from 3:10 up to 5:55 hrs. Not one of these shows as little prolongation of late prophase as the very thick one. Compared with the latter 16 of the 21 roots also indicate a smaller influx into early prophase and more prolongation of metaphase, while in the remaining five roots at least one of these effects is stronger. With $P = 0.017$ (PATAU, 1952, b, table 3) a mere chance coincidence in one out of 22 roots between largest D and smallest treatment effects can be ruled out. Quite likely no treatment effect is wholly independent of the root size.

A general negative regression of effects on D suggests a simple common explanation such as a different rate of intake, caused, perhaps, by the smaller surface of thicker roots relative to their volume. This interpretation can also account for the existence of a critical root diameter at and below which at least one or two effects suddenly assume a very severe character as described under (b). There may be a threshold concentration of sodium nucleate (or, possibly, of a physiologically more active derivative) in the cell beyond which it inhibits entirely certain processes such as the breakdown of the membrane of late prophase nuclei.

If the existence of a critical D were due to the existence of such a threshold concentration, and if the sodium nucleate (or its active derivative) went on accumulating in the cell during the whole duration of the treatment, the critical D would certainly be expected to increase with time. This, however, does not happen to any appreciable extent, as Fig. 12 shows. This could mean that the concentration of "sodium nucleate" in the cell does not increase, or at least not much, after an initial period. The concentration, depending on the root size, might be maintained as a balance between intake and one or both of two opposing processes: a transport of "sodium nucleate" to higher parts of the root and a decomposition of this substance into less active derivatives.

A fairly constant "sodium nucleate" concentration in the cell, after an initial rapid increase, would not necessarily cause the cytological effect also to remain constant. The sustained action of an agent on cells may result either in a physiological adjustment, that is in a constant response, or in continuously progressing changes as is typical for severe poisoning. Both these modes do, indeed, occur in the present experiment.

The frequency of early prophase nuclei goes on decreasing (Fig. 4). The degree of spindle disorientation, on the other hand, remains about the same from 3 hrs onwards (Fig. 10) although the existence of a regression of this degree on D during the later period (Fig. 15) shows that the degree has not reached its potential maximum in all roots. The

most convincing case of this kind is furnished by the percentage of sticky prometa- and metaphases (Fig. 11, middle) which after the first three hours is still low enough for another great increase but does not show any, while the percentage of irregular anaphases (Fig. 11, top) rises during the whole time [to test this difference between the two effects the quotients (% sticky prometa. + meta./% irreg. ana.) were formed: their negative regression coefficient (on time) renders $t_0 = 3.46$; $P = 0.014$].

The almost complete inhibition of the transition from prophase to prometaphase in roots with $D \leq 0.50$ mm (Fig. 6, bottom) and the, possibly closely related, steep rise in the frequency of single pyknotic masses in these thin roots (Fig. 11, bottom) appear rather suddenly at a fairly late time. This again in no way indicates an increase in the concentration of "sodium nucleate" in the cell. It has been found in other experiments to be published later (an analysis of a long period after the end of the treatment is in progress) that the most severe effects are reached several hours after the end of the treatment when the sodium nucleate concentration cannot possibly have increased further.

To be contrasted with the variety of time relationships displayed by the different effects from 3 hrs onwards is the fact that everyone of these develops to a significant degree within the first two or three hours. This, and in particular the apparent constancy of some effects from 3 hrs onwards, in conjunction with the lack of a noticeable change in the critical value of D strongly favours the conclusion that the sodium nucleate concentration (or that of an active derivative) in the cell reaches a level within the first two or three hours which is determined by the root diameter and which is not changed greatly thereafter.

The types (b) and (c) of relations between root size and treatment effects seem capable of a fairly simple explanation which, as has just been pointed out, links up with other observations. The existence of the type (a) relation, however, shows that around 3 hrs unknown complicating factors come in, about which to speculate seems futile at present.

Discussion.

The, presumably steady, decrease of the influx into early prophase is probably the result of increasing damage to resting nuclei and can adequately be called "preprophase inhibition of mitosis" (D'AMATO, 1950). That such damage occurs is evidenced amply by the, often great, visible changes in the appearance of resting nuclei at later times of the treatment. Other experiments, still in progress, indicate that small roots often do not survive. Most roots, however, finally appear to recover fully. The effects on later mitotic stages show that the treatment, however indirectly, interacts with more than one of the different processes

constituting a mitosis, thus producing what may be called "primary" visible disturbances which in turn may cause "secondary" mitotic effects to follow. The spindle disturbances represent, in this sense, at least one "primary" effect which probably accounts for the anaphase prolongation as a "secondary" one.

Another "primary" effect is certainly the increasing prolongation of the late prophase which, together with the prolongation of the metaphase, causes the strong reduction in the frequencies of anaphases and telophases already found by KODANI (1948) and ALLEN (1950). A case has been made above for interpreting also the induced shortening of late prophase, prometa- and metaphase chromosomes as a direct result of the prolongation of late prophase. The prolongation of late prophase can be best understood as a delay of the breakdown of the nuclear membrane. Such an inhibition might well be caused by some comparatively simple physicochemical change which could be brought about by a great variety of agents. This, indeed, has been shown to be the case by D'AMATO (1950 and earlier papers). The fact that of all mitotic features examined in untreated roots, only the transition from prophase to prometaphase was found to have a marked regression on the root diameter seems also to indicate a particular sensitivity of this transition to the cell-physiological situation.

The observed effects of the treatment can all be described in terms of delay, disorientation, irregularity, stickiness, pyknotic degeneration, etc. The only effect which could be interpreted as a stimulation of a normal process, the increased chromosome contraction, seems likely to be the result of a delay. What we are dealing with appear to be exclusively toxic effects. Some of them are in their individual appearance quite specific but the treatment effect as a whole is not. Its very diversity makes it entirely questionable whether any of the effects bears a direct relation to the sodium nucleate. They may be nothing but different symptoms of a physiological derangement. The few distinguishable cytological processes must be ultimately dependent on such a complicated pattern of biochemical reactions that any number of quite different chemical interactions with links of this pattern may lead to the same visible result. A single disturbance of this pattern at a point which is biochemically far removed from visible effects may well affect several of them, even if these have no direct relation to each other. An analysis of the underlying biochemical mechanism would require in the first place agents which produce highly specific effects. LOVELESS and REVELL (1949) have stressed the non-specific action of most toxic agents, except colchicine, of which mitotic effects have been described. We agree with these authors that such unspecific agents should not be called "mitotic poisons."

The possibility is, of course, not denied that sodium nucleate might also have a direct inhibiting or even stimulating effect on the one or other particular mitotic process. The effects which most readily attract suspicion of being possibly of this kind are those which appear at an early time and do not increase much afterwards. Disturbances of basic cell-physiological processes seem likely to affect directly and indirectly more and more other processes and thus gradually an increasing number of those which determine visible features. Effects which appear early, which do not seem to be secondary to other observed effects, and which do not increase appreciably from 3 or even 2½ hrs onwards, are the disorientation of metaphase spindles and the increased frequency of prometa- and metaphases with sticky chromosomes¹.

The frequency of irregular anaphases, on the other hand, increases steeply from 3 hrs onwards but it is still low at this time, thus showing exactly the time relationship to be expected from symptoms of a physiological derangement which are far removed from the initiating first reactions. And, indeed, this type of spindle disturbance has been reported as inducible by such a variety of agents and conditions that its character as a ready indicator of a general physiological derangement can hardly be questioned. Still more sensitive indicators of this are apparently the preprophase inhibition of resting nuclei and, what seems to be, an inhibition of the breakdown of the nuclear membrane. This, at any rate, is the interpretation we would put on D'AMATO's results (1950, and earlier papers). He has found that a large number of different chemicals (to which now sodium nucleate can be added) induces a "prolongation of prophase duration and inability of this stage to reach metaphase." He reports "prophase poisoning" to be "always contemporary with preprophase inhibition of resting nuclei." "C-mitotic" effects of such substances have, according to D'AMATO, always a higher threshold value than the prophase poisoning. This agrees well with the fact that in the present experiment the irregular anaphases appear later than the "prophase poisoning." D'AMATO stresses the difference between typical "c-mitotic" poisons as colchicine and these "chemical cell poisons" and the parallelism between effects of the latter and those of radiation as a "physical cell poison." We would, however, not interpret the co-occurrence of preprophase inhibition and of late prophase prolongation in poisoned cells as indicating a direct relation between two quite different processes.

¹ DARLINGTON (1942) has suggested that stickiness of chromosomes is due to a disturbance of their nucleic acid metabolism. If this should be the case we would still not attach any particular significance to the fact that a nucleate acid salt can produce stickiness. For other agents which can do the same, see D'AMATO (1948).

There is no particular reason to suspect the presence of enough impurities in the commercial sodium nucleate to influence the cytological effects. No attempt has been made, to check this point, as a chemical interpretation of the results seemed futile anyway. Impurities would not impair the value of the substance both for increasing the frequency of the rare reductional groupings and as an analytical tool which, as any agent capable of changing a normally fixed pattern of processes, may help to reveal their mutual relations.

In view of the increasing amount of quantitative work now being done on mitotic effects in chemically treated roots it may not be amiss to discuss the somewhat intricate methodological problems upon the proper handling of which the success of such studies greatly depends. Some of the results of the present work underline the importance of these problems rather strikingly.

Treatment effects depend on at least two variates: concentration and duration. If fixations are made some time after the end of the treatment this time represents a third variate. It will rarely be feasible to explore all of them equally thoroughly for their influence on the effects. Some kind of survey, however, has to be made. Such preliminary experiments deserve the most careful planning. To cut down too much on the number of roots per sample, especially in the controls, may turn the whole effort into a waste of time. A great saving of work, however, can be achieved by simplifying the scoring if the effects to be studied are expected to occur with a relatively high frequency. Counts of, say, 50 mitoses per root or even mere "impressions," if they are gathered from coded slides (see below) may give a perfectly valid basis for choosing optimal values for the one or two variates to be kept constant in a major experiment.

Whether, after a preliminary scoring, regressions on time or on concentration should be studied more closely depends, of course, on the kind of question the work is meant to answer. Time series are perhaps likely to display the greater diversity of effects, in particular if extended over a longer period after the end of the treatment. It has been shown above how the development of different effects in time can be used to distinguish tentatively between those which may possibly be caused more or less directly by the agent and those which most likely are no more than mere symptoms of a general physiological derangement. The variation in time of different effects may also shed some light on their mutual relations.

In roots of *Rhoeo*, sodium nucleate (or its active derivate) seems to reach about its maximum concentration in the cell within the first two or three hours of the treatment. At any rate, this duration is enough to

produce practically all effects. The minimum efficient duration of a treatment with a toxic agent is easily overestimated, as at any early time the more striking effects of a general deterioration have hardly begun to appear. For this very reason early fixations should be of special interest. A sufficiently short duration of the treatment has also the unique advantage of excluding directly an origin in the resting stage of such chromosomal effects as may have appeared than at, say, metaphase. In the present experiment this could possibly apply to the greatly increased incidence of sticky prometa- and metaphase chromosomes at about 3 hrs. According to PATAU (1952a) the total prophase in roots of *Rhoeo* seems to last considerably longer than three hours.

ÖSTERGREN (1950) has, rightly, stressed the desirability of "standardization in a physiological, a genetical as well as a cytological respect." None of this, however, will do away with the necessity of certain precautions against systematic errors. There is, for instance, always a possibility that roots from the same plant are more alike than roots from different plants. Experiments with *Allium* in this laboratory have amply demonstrated that a standard error computed from roots of the same bulb can be worse than useless for the comparison of root samples from different bulbs. If different treatments are applied to different plants the standard error of a difference in response can be obtained only from different plants treated alike.

Another possibility to be reckoned with is a correlation between some visible feature of roots or plants and cytological effects. The present study has provided a rather extreme example of such a correlation, namely that between root diameter and effects. A subconscious selection for visible features when choosing roots to be fixed can be excluded definitely only by randomizing both plants and roots. This, of course, does not decrease the large standard error which a strong regression as that in *Rhoeo* will introduce but it eliminates systematic errors. The standard error can be decreased by standardization. However, if a plant, like *Rhoeo*, has a very variable root size, this cannot be selected for too sharply, or not enough roots will be left. Furthermore, the existence of a critical value D in *Rhoeo* shows that with bad luck even a very restricted range of the root diameter may still contain a large regression on root size. Standardization can be very useful but is no substitute for randomization.

The standard error can also be brought down in a different and often more efficient way by using deviations from regression, instead of deviations from the mean, and by comparing adjusted means. Even rather poor regressions can thus greatly improve the significance of the difference between two samples, as the case of Fig. 5 shows. Here the analysis of covariance rendered $P=0.004$ (table 2) while the simple t -test gives

only $P=0.022$ ($t_{13}=2.80$). The accuracy of results obtained by such methods from the very variable roots of *Rhoeo* seems to be in no way inferior to that which can be achieved with the morphologically rather homogeneous roots of *Allium*. For quantitative work with roots which vary noticeably in size we would now always measure their diameter.

Unless the features to be scored are rare, the accuracy of mean values is limited not so much by the sampling variance per root as by the variability between roots. It may be doubted whether complete counts of mitoses are ever worth the effort in roots which contain as many as do those of *Allium*. One hundred mitoses each from two roots can give more information than 600 from one. With sections at least, incomplete counts can be made to show even the changes in absolute frequencies. This requires correction factors based on estimates of the meristem volume analyzed. In roots of variable size, corrected numbers from incomplete counts will not only save time but may be greatly superior to complete counts by their smaller variance. In the present study corrected numbers proved extremely useful.

Many mitotic features cannot be scored other than by rather subjective and not entirely reproducible standards. This situation opens two sources of error: unconscious bias and unconscious shifts of standard during the duration of the analysis. Such shifts with their deleterious effect on the accuracy of the results cannot by any means be excluded for certain. But they can be prevented from producing systematic errors by doing the analysis in a sequence which bears no consistent relation to the different treatments. Bias can often entirely be eliminated from influencing the scoring by using coded slides. We feel that this should become a standard routine in quantitative cytological work. The precaution breaks down, of course, once the effects of the treatment have reached a degree which makes it possible to recognize treated roots by their appearance. This is another reason for recommending fixations after a short duration of the treatment when the more striking symptoms of damage have not yet appeared.

ÖSTERGREN (1950) has put forward a "strong warning" against using ill defined standards of judgement in quantitative work. This warning is very justified if the scoring is not done with coded slides but does not apply if the observer can be kept entirely ignorant of the treatment received by the individual root. Percentages, as such, of ill-defined phenomena are, of course, more or less meaningless as they cannot be strictly reproduced but observed changes in frequencies will be just as reliable as their statistical significance indicates. The importance of observing treatment effects at the earliest possible time has been stressed above. This in many cases will be made impossible by an insistence on rigidly defined standards. In general the most poorly defined effects are the

ones most in need of a quantitative approach based on truly blind scoring, for only in this way may their relation to the treatment, or even their very existence be proved.

Summary.

The induction by sodium nucleate (8%) of the following effects has been studied quantitatively in roots fixed at close time intervals during and shortly after six hours of treatment:

- (1) A decrease in the frequency of nuclei entering prophase.
- (2) A prolongation of late prophase, presumably due to an inhibition of the breakdown of the nuclear membrane. This prolongation seems to be the cause of
 - (2'), an increase of chromosome contraction at late prophase and subsequent stages.
- (3) A prolongation of metaphase. This together with the late prophase prolongation results in
 - (3'), a strong decrease in the frequency of anaphases and telophases.
- (4) A disorientation of metaphase spindles.
- (5) Irregular anaphases, apparently causing
 - (5'), a prolongation of anaphase.
- (6) Pyknotic degeneration of nuclei.
- (7) Stickiness of prometa- and metaphase chromosomes.

All effects appear within the first two or three hours of the treatment but there are considerable differences between the time curves of different effects. Many or all of these are probably symptoms of a cell-physiological derangement rather than results of a direct interaction of sodium nucleate with specific mitotic processes.

Most or all of the effects are stronger in smaller roots. A root diameter of 0.5 mm appears, in some respects, as a critical value. There are indications that the sodium nucleate (or, possibly, a physiologically more active derivative) reaches a maximum concentration in the cell within the first two or three hours without much change thereafter, and that this concentration depends on the root size.

Safeguards against systematic errors and methods for improving the statistical efficiency of quantitative cytological work on root tips are discussed.

Bibliography.

- ALLEN, N. S.: Induced mitotic "reductional groupings" in root tips of tetraploid *Tradescantia*. M. S. Thesis (unpublished). University of Wisconsin 1950. — D'AMATO, F.: The effect of colchicine and ethylene glycol on sticky chromosomes in *Allium cepa*. *Hereditas* **34**, 83-103 (1948). — The quantitative study of mitotic poisons by the *Allium cepa* test: data and problems. *Protoplasma* (Wien) **39**, 423-433 (1950). — DARLINGTON, C. D.: Chromosome chemistry and gene action. *Nature* (Lond.) **149**, 66-69 (1942). — DARLINGTON, C. D., and P. T. THOMAS: The breakdown of cell division in a *Festuca-Lolium* derivative. *Ann. of Bot.*, N. S.

1, 747-761 (1937). — GAVAUDAN, P.: Étude quantitative de l'action mito-inhibitrice des substances aromatiques: Définition et terminologie des effets cytologiques utilisés comme test. C. r. Soc. Biol. Paris **137**, 281-283 (1943). — HUSKINS, C. L.: Segregation and reduction in somatic tissues. I. Initial observations on *Allium cepa*. J. Hered. **39**, 310-325 (1948). — HUSKINS, C. L., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. IV. Reductional groupings induced in *Allium cepa* by low temperature. J. Hered. **41**, 13-18 (1950). — HUSKINS, C. L., and L. CHOUINARD: Somatic reduction: diploid and triploid roots and a diploid shoot from a tetraploid *Rhoeo*. Rec. Gen. Soc. Amer. **18**, 95 (1949). Genetics **35**, 115 (1950). — HUSKINS, C. L., and L. M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development. I. Heterochromatic bodies in energic nuclei of *Rhoeo* roots. J. Hered. **39**, 35-43 (1948a). — The nucleus in differentiation and development. II. Induced mitoses in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. J. Hered. **39**, 67-77 (1948b). — KODANI, M.: Sodium ribose nucleate and mitosis. J. Hered. **39**, 327-335 (1948). — LOVELESS, A., and S. REVELL: New evidence on the mode of action of "mitotic poisons." Nature (Lond.) **164**, 938-944 (1949). — MARQUARDT, H.: Die Röntgenpathologie der Mitose I und II. I. Der Primäreffekt weicher Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Scilla campanulata*. Z. Bot. **32**, 401-482 (1938). — ÖSTERGREN, G.: Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. Hereditas (Lund) **30**, 429-467 (1944). — Cytological standards for the quantitative estimation of spindle disturbances. Hereditas (Lund) **36**, 371-382 (1950). — PATAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel.) Biol. Zbl. **63**, 152-168 (1943). — A correlation between separation of the two chromosome groups in somatic reduction and their degree of homologous segregation. Rec. Gen. Soc. Amer. **18**, 108 (1949). Genetics **35**, 128 (1950). — The duration of mitosis in root tips of *Rhoeo*. In preparation (1952a). — Significance of a fourfold table with 0, 0 in one diagonal. In preparation (1952b). — The significance of a ratio of means. In preparation (1952c). — PATAU, K., and L. M. STEINITZ: Reductional groupings in root tips of *Rhoeo discolor* HANCE. J. Hered., in the press (1952). — WADA, B.: Studien zur Kausalanalyse der Mitose. I. Die Mitoseablaufkurve bei den *Tradescantia*-Haarzellen. Cytologia **13**, 323-336 (1944). — WILSON, G. B., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. II. The separation of homologous chromosomes in *Trillium* species. J. Hered. **40**, 2-6 (1949).

Prof. Dr. K. PATAU, Dep. of Botany (Cytology),
University of Wisconsin, Madison, Wisc., USA.

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
**DAS VERHALTEN DER NUCLEOLEN WÄHREND DER MEIOSIS
VON *SOLANUM LYCOPERSICUM*.**

Von
WERNER GOTTSCHALK.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. August 1951.)

A. Einleitung.

Der Formwechsel der Nucleolen in den Zellkernen während des Ablaufs von Mitosis und Meiosis und die Beziehungen zwischen Nucleolen und Satellitenchromosomen haben sich bei nahezu allen daraufhin untersuchten Objekten als sehr gleichförmig erwiesen. Demnach sind alle Abweichungen vom üblichen Schema von besonderem Interesse, weil sich mit deren Hilfe möglicherweise eine Einsicht in die Funktionen des Nucleolus vorbereiten läßt. Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Meiosis in den Pollenmutterzellen (PMZ) von *Solanum lycopersicum* wurde bei diesem Objekt ein von der Norm abweichendes Verhalten der Nucleolen festgestellt, das nun in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden soll. Dem eigentlichen Gegenstand unserer Abhandlung werden Untersuchungen über das Ausreifen der Pollensäcke von *Solanum lycopersicum* vorangestellt, weil dadurch die methodischen Voraussetzungen für eine genauere Bearbeitung des Nucleolenverhaltens in der meiotischen Prophase erworben werden. Zur Ergänzung der Befunde wurden einige andere Arten der Gattung *Solanum* sowie verschiedene Vertreter sonstiger Gattungen unter den *Solanaceen* auf das Verhalten ihrer Nucleolen geprüft, um die Verbreitung der von uns bei *Solanum lycopersicum* konstatierten Erscheinung zu ermitteln.

B. Material und Methode.

Als Untersuchungsmaterial wurden junge Antheren in Carnoy 3:1 fixiert, mit Eisenkarmin nach GRITLER (1949) gefärbt und als Quetschpräparate verarbeitet. Als hauptsächlichstes Objekt diente *Solanum lycopersicum*; ergänzende Untersuchungen wurden an 22 anderen *Solanum*-Arten, ferner an einigen Vertretern der Gattungen *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Nicandra*, *Nicotiana* und *Physalis* durchgeführt.

C. Empirischer Teil.

**1. Das Ausreifen der Pollensäcke in den Antheren
von *Solanum lycopersicum*.**

Um Klarheit über das Nucleolenverhalten während der Meiosis von *Solanum lycopersicum* zu erhalten, ist es notwendig, unmittelbar

Tabelle 1. Die Ausreifung der Pollensäcke

Nr. der Anthere	Teil der Anthere	Ruhe-kern	De-konden-sation	Lepto-tän	Zygo-tän	Pachy-tän	Diplo-tän	Dia-kinese	1. Meta-phase
1	Basis	100,0							
	Mitte	91,9	8,1						
	Spitze	47,3	52,7						
2	Basis		68,9	31,1					
	Mitte		61,4	38,6					
	Spitze		28,0	72,0					
3	Basis			42,2	57,8				
	Mitte			7,1	92,9				
	Spitze				100,0				
4	Basis				98,2	1,8			
	Mitte				96,0	4,0			
	Spitze				84,8	15,2			
5	Basis						92,6	7,4	
	Mitte						58,5	41,5	
	Spitze						26,4	73,6	
6	Basis						2,1	97,8	0,1
	Mitte						0,1	62,3	37,0
	Spitze							13,5	84,2
7	Basis						0,2	37,5	34,0
	Mitte							6,4	70,0
	Spitze							7,6	46,2
8	Basis							46,4	18,6
	Mitte							31,3	5,1
	Spitze								
9	Basis						8,2	30,4	23,9
	Mitte						1,0	2,0	10,9
	Spitze							0,9	
10	Basis						0,1	0,4	1,7
	Mitte								
	Spitze								
11	Basis								
	Mitte								
	Spitze								
12	Basis								
	Mitte								
	Spitze								
Gesamtzahl der ausgezählten PMZ									

Übersicht über Stadienstreuung und Stadienhäufigkeit, getrennt untersucht tualen Anteil der meiotischen Stadien innerhalb des betreffenden Anthereanteils an.

aufeinanderfolgende frühe meiotische Entwicklungsstadien, die morphologisch kaum unterscheidbar sind, zeitlich richtig in den Stadienablauf der Meiosis einzuordnen. Nun lassen sich geringfügige Entwicklungsunterschiede dadurch erfassen, daß sich Differenzen in der meiotischen

von *Solanum lycopersicum*.

1. Ana- phase	1. Telo- phase	1. Inter- phase	2. Meta- phase	2. Ana- phase	2. Telo- phase	2. Inter- phase	Stadium der Membran- bildung	Fertige Gonen	Anzahl der aus- gezählten PMZ
									572
									954
									319
									473
									1315
									143
									187
									184
									99
									167
									299
									407
									745
									265
									978
									1978
0,6									2259
2,3									266
27,5	0,3	0,5							635
23,6									593
41,5	4,7								106
7,7	8,7	18,5	0,1						892
6,1	14,2	25,2	8,9	1,0	8,2				825
		1,4	2,8	0,7	76,9	18,2			286
3,1	11,6	22,8							510
1,1	9,5	46,0	14,8	0,5	14,0	0,2			952
	0,7	2,4	2,4	0,4	2,8	90,2	0,2		459
1,3	17,5	74,8	3,1	0,8		0,3			771
		21,9	29,9	8,6	36,6	3,0			880
0,2		0,7	3,2	1,4	15,6	78,9			431
		33,4	34,4	5,6	26,6				1154
			14,7	0,9	84,4				1891
			31,3	1,1	31,3	36,3			938
					2,1	97,8	0,1		1747
						80,1	19,9		944
						28,5	50,8	20,7	309
									25933

für Antherenspitze, Mittelteil und Antherenbasis. Die Zahlen geben den prozen-
(Erläuterungen im Text.)

Stadienverteilung zwischen PMZ aus verschiedenen Regionen der gleichen
Anthere nachweisen lassen. Um das zu erreichen, wurden Antheren,
deren PMZ die Meiosis durchlaufen, in 3 Teile zerschnitten und Spitze,
Mittelteil und Basis getrennt auf Stadienstreuung und Stadienhäufigkeit

untersucht. Auf diese Weise konnte ein Test für die zeitliche Abfolge der Nucleolenbilder während der frühen Stadien der Meiosis erworben werden.

Die Gesamtzahl der in einer Anthere von *Solanum lycopersicum* vorhandenen PMZ liegt bei etwa 5000. Die Antheren, deren PMZ die Diakinese und die späteren Stadien der Meiosis durchlaufen, weisen eine breite Stadienstreuung auf; die PMZ des gleichen meiotischen Entwicklungsstadiums liegen jedoch stets gruppenweise zusammen. Um festzustellen, ob wirklich ein Entwicklungsvorsprung einer bestimmten Antherenregion gegenüber anderen Regionen vorliegt, ist es notwendig, in jedem der 3 Antherenteile eine möglichst große Anzahl von PMZ auf Stadienhäufigkeit und den Streuungsgrad auszuzählen. In unseren Untersuchungen wurden je Anthere durchschnittlich mehr als 2000 PMZ, also knapp die Hälfte aller vorhandenen PMZ, erfaßt. Weiterhin erwies es sich als notwendig, die späten Entwicklungsstadien der zweiten meiotischen Teilung genauer aufzugliedern als es sonst üblich ist. Das Stadium der „Tetraden“ wird in die zweite Telophase, die zweite Interphase (= Auflockerung der Tetradenkerne und Bildung der Nucleolen) und in das Stadium der Membranbildung der jungen Gonen innerhalb der Hülle des Gonotokonten unterteilt.

Die Ergebnisse der Auszählungen von insgesamt fast 26000 PMZ aus 12 Antheren sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Es geht daraus hervor, daß in der Antherenbasis stets das *frühere*, in der Antherenspitze das *spätere* meiotische Entwicklungsstadium den größeren prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der ausgezählten PMZ einnimmt. Demnach treten die PMZ in der Antherenspitze als erste in die Meiosis ein, und es läßt sich während des gesamten Stadienablaufs stets ein deutlicher Entwicklungsvorsprung der apikal gelegenen PMZ gegenüber den tiefer gelegenen feststellen. Besonders deutlich tritt diese Regel, die für *Solanum lycopersicum* ohne Ausnahme gilt, in den schnell ablaufenden *späteren* Stadien in Erscheinung (Antheren Nr. 8–10 der Tabelle 1).

2. Das Verhalten der Nucleolen im prämeiotischen Ruhekern und in der meiotischen Prophase.

In der letzten *prämeiotischen Telophase* von *Solanum lycopersicum* bilden die in jedem Kern vorhandenen 2 Satellitenchromosomen zunächst unabhängig voneinander je einen Nucleolus. Kurz nach ihrer Entstehung jedoch verschmelzen die beiden Kernkörperchen miteinander, und zwar in der überwiegenden Anzahl aller Fälle bereits im Verlauf der Bildung des prämeiotischen Ruhekerns. Im späten *Zygotän* und im *Pachytän* treten in wechselnden, zum Teil sehr hohen Prozentsätzen wiederum 2 gleich oder verschieden große Nucleolen auf, die niemals getrennt im Kernraum liegen, sondern sich stets berühren (Abb. 4 und 5). Man ist zunächst geneigt, anzunehmen, daß in diesen Kernen der Verschmelzungsprozeß der Nucleolen nicht unmittelbar nach ihrer Bildung abgelaufen ist, sondern für einen Teil der PMZ bis zum Zygotän oder Pachytän hinausgeschoben wurde. Daß dies nicht der Fall ist, werden die folgenden Untersuchungen zeigen.

In der Abb. 1 sind die späten prämeiotischen und die frühen meiotischen Entwicklungsstadien bezüglich der Anzahl ihrer Nucleolen je Kern miteinander verglichen. Auf der Abszisse sind die Stadien: prämeiotische Telophase bis Diplotän aufgetragen, auf der Ordinate befindet sich der prozentuale Anteil der Kerne mit 2 Nucleolen an der Gesamtzahl der ausgezählten PMZ einer Anthere. Für jedes der in der Abbildung berücksichtigten Entwicklungsstadien wurden 20 Antheren verwendet. Die ausgezogene Kurve gibt die Mittelwerte der Auszählungen aus diesen

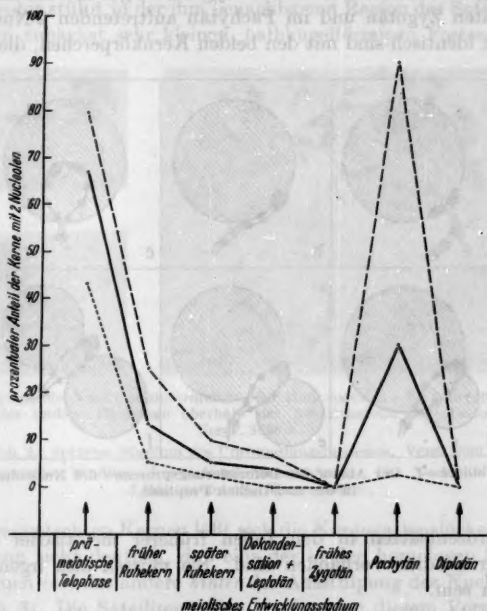


Abb. 1. Das Auftreten von Kernen mit 2 Nucleolen in verschiedenen aufeinanderfolgenden prämeiotischen und meiotischen Entwicklungsstadien der Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. (Erläuterung im Text.)

20 Antheren je Stadium an, während die gestrichelte und punktierte Kurve die vorgefundenen Maximal- bzw. Minimalwerte wiedergeben. Das Stadium des prämeiotischen Ruhekerns wurde in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Unter „spätem Ruhekern“ soll dabei der Zustand des Kerns unmittelbar vor Eintritt in die Meiosis verstanden werden; es wurden für die Auszählung dieses Stadiums nur Antheren verwendet, in denen neben Ruhekernen bereits Dekondensationen gefunden wurden. „Frühe Ruhekerne“ hingegen sind Kerne, welche die letzte prämeiotische Mitose soeben durchlaufen haben. Sie unterscheiden sich außer in ihrer Größe nur in der Anzahl ihrer Nucleolen von den „späten Ruhekernen“ und wurden aus Antheren verwendet, die nur etwa halb so groß waren wie normale Ruhekern-Antheren.

Aus dem Kurvenverlauf ergibt sich, daß der Anteil der Kerne mit 2 Nucleolen durch den Verschmelzungsprozeß von der prämeiotischen

Telophase bis zu den frühesten meiotischen Stadien stark absinkt. Er erreicht im frühen Zygotän den Wert Null, steigt jedoch im späten Zygotän und im Pachytän wieder bis auf maximal 90% an, sinkt im Diplotän wiederum auf weniger als 1% ab und erreicht in der frühen Diakinese endgültig den Wert Null. Der Kurvenverlauf beweist, daß die Verschmelzung der Nucleolen im frühen Zygotän abgeschlossen ist und daß die im späten Zygotän und im Pachytän auftretenden 2 Nucleolen je Kern nicht identisch sind mit den beiden Kernkörperchen, die in wech-

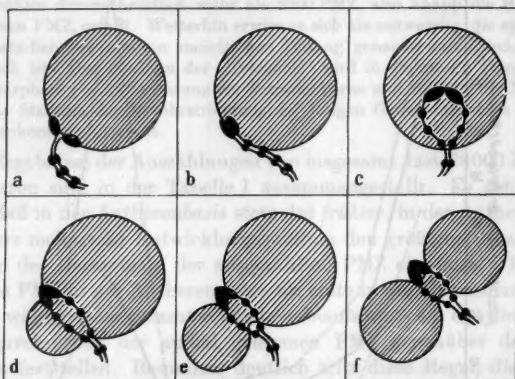


Abb. 2a—f. Der Ablauf des Deformierungsprozesses des Nucleolus in der meiotischen Prophase.

selnden Prozentsätzen in den Zellen früherer meiotischer und prämeiotischer Stadien vorhanden sind. Sie müssen also irgendwie neu entstanden sein.

Untersucht man nun die Struktur der beiden benachbarten *Pachytän-nucleolen* genauer, so findet man regelmäßig eine Verbindungsbrücke zwischen ihnen, die in allen Fällen von nahezu konstantem Durchmesser ist, gleichgültig, ob die beiden Nucleolen gleich- oder verschieden groß sind. *Es handelt sich also nicht um zwei isolierte Körper, die ihre benachbarte Lage nur der Konjugation der beiden Satellitenchromosomen verdanken, sondern um einen einzigen Körper, der in der Mitte eingeschnürt ist. Es liegen nicht zwei konjugierte, sondern ein geteilter Nucleolus vor, dessen Entwicklungsgeschichte im folgenden näher untersucht werden soll.*

Im mittleren Zygotän, in einem Stadium, in dem die meisten homologen Chromosomen ihre Parallelkonjugation bereits vollzogen haben und nur noch wenige Bivalente über kurze Strecken hinweg nicht konjugiert sind, kann der Beginn eines *Gestaltwechsels* des noch völlig einheitlichen Nucleolus beobachtet werden (Abb. 2—5). Die heterochromatischen

Partien der beiden homologen Satellitenchromosomen sind in diesem Stadium bereits gepaart. Der Prozeß wird dadurch eingeleitet, daß die vollzogene Parallelkonjugation im Heterochromatin des Satellitenbivalents in einer bestimmten, eng begrenzten Region von 2—3 Makrochromomeren wieder rückgängig gemacht wird. Es entsteht auf diese Weise eine Konjugationslücke, durch die Nucleolarsubstanz hindurchgeschoben wird: Der Nucleolus stülpt in der ihm benachbarten Region des Satellitenbivalents einen zunächst sehr kleinen, halbkugelförmigen Fortsatz aus. In



Abb. 3. Beginnende Nucleoluumformung. Ein Homologes des SAT-Bivalents verläuft unterhalb, das andere Homologe oberhalb der Austrittsstelle der Nucleolarsubstanz. Vergr. 3800 \times .

Abb. 4. Späteres Stadium des Umwandlungsprozesses. Verg. 3800 \times .

Abb. 5. Extremstes Stadium des Deformierungsprozesses: Der Nucleolus hat sich in 2 Hälften geteilt. Vergr. 3800 \times .

schwach gequetschten Kernen läßt sich die Konjugationslücke gut beobachten; man sieht deutlich, daß eins der beiden homologen Satellitenchromosomen *vor*, das andere *hinter* der Ausstülpung des Nucleolus verläuft (Abb. 3). Die Satelliten selbst werden von diesem Vorgang nicht betroffen. Im weiteren Verlauf des Deformierungsprozesses gelangt immer mehr Substanz aus dem Nucleolus in den seitlich ausgestülpten, kugelförmigen Körper hinein, so daß dessen Volumen auf Kosten des ursprünglich einheitlichen Nucleolus mehr und mehr zunimmt. Im frühen Pachytän erreicht die Umwandlung ihr extremstes Stadium: Beide Teile des Nucleolus sind gleich groß, und es läßt sich nicht mehr feststellen, welcher von beiden der ursprüngliche Körper ist. Charakteristisch ist außerdem, daß die Durchtrittsstelle, durch welche die Nucleolarsubstanz während des Umformungsprozesses zwischen den beiden gepaarten Satellitenchromosomen hindurchtreten kann, nicht größer wird. Es ist also die Konjugation der beiden Satellitenchromosomen stets nur in einer ganz bestimmten Region aufgehoben. Nachdem der Vorgang ein Stadium erreicht hat, in dem die beiden Nucleolenteile gleich groß sind, wird er

wieder rückläufig: Eine der beiden Hälften gibt Substanz an die andere ab, wird immer kleiner und verschwindet schließlich ganz. Daraufhin wird die Konjugationslücke zwischen den SAT-Chromosomen geschlossen, so daß der Normalzustand meist im mittleren bis späten Pachytän wieder hergestellt ist. Es läßt sich nicht feststellen, ob im Anschluß an das Stadium extremster Umformung der ganze Prozeß rückgängig gemacht wird, indem der „Ableger“ wieder vom ursprünglichen Nucleolus aufgenommen wird, oder ob die noch vorhandene Substanz des ursprünglichen Nucleolus völlig in die Ausstülpung hinüberwandert. Der Endeffekt ist in jedem Falle der gleiche.

Der Umwandlungsvorgang des Nucleolus findet sich stets in den gleichen meiotischen Stadien mit nur ganz geringen zeitlichen Schwankungen. Gewöhnlich beginnt die Deformierung im späten Zygotän, erreicht im frühen Pachytän ihr extremstes Stadium und wird im weiteren Verlauf des Pachytäns wieder rückläufig. In einigen Antheren wurde ein etwas früherer Beginn des Prozesses festgestellt, so daß der geteilte Nucleolus nur noch ganz vereinzelt auftrat. In anderen Fällen hatte eine geringe zeitliche Verschiebung in Richtung auf das mittlere Pachytän hin ein Auftreten noch einiger weniger geteilter Nucleolen im Diplotän zur Folge. Ihre Anzahl lag jedoch unterhalb von 1% der ausgezählten Kerne. Diese geringen zeitlichen Verschiebungen sind die Ursache für die breite Streuung, in der der geteilte Nucleolus im Pachytän von *Solanum lycopersicum* auftritt (Abb. 1).

Man kann nun die Verteilung der Umformungsstadien des Nucleolus auf die Stadien der Meiosis und diese wiederum auf ihre Verteilung in Spitze, Mitte und Basis einzelner Antheren untersuchen. Das geschah in der Weise, daß von 12 Antheren, in denen der Umwandlungsprozeß der Nucleolen gerade ablief, Antherenspitze, Mittelteil und Basis getrennt auf das Vorhandensein von normalen oder geteilten Nucleolen in Verbindung mit dem jeweiligen meiotischen Entwicklungsstadium ausgezählt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Sie entspricht in ihrem Aufbau der Tabelle 1, nur daß hier Zygotän und Pachytän unterteilt sind in je ein Stadium mit normalem und eines mit geteiltem Nucleolus. Die Zahlen der Tabelle 2 geben den prozentualen Anteil der PMZ an, der innerhalb eines jeden Antherenteils für das betreffende meiotische Entwicklungsstadium gefunden wurde. Die Summe der Zahlen der verschiedenen Stadien eines Antherenteils ergibt jeweils 100%.

Die Anthere 1 hat das Stadium der Nucleolenumformung noch nicht erreicht. Die Antherenbasis steht mit der knappen Hälfte ihrer PMZ noch im Leptotän, während alle PMZ der Antherenspitze bereits das frühe Zygotän erreicht haben. In keiner Zelle machen sich irgendwelche Anzeichen einer Veränderung der Nucleolen bemerkbar. Aufschlußreicher ist die Anthere 2: Ihre PMZ durchlaufen das Zymo-

Tabelle 2. Die Umformung des Nucleolus in den frühen Stadien der Meiosis.
(Erläuterung im Text.)

Nr. der Anthere	Teil der Anthere	Leptotän, normaler Nucleolus	Zygotän, normaler Nucleolus	Zygotän, geteilter Nucleolus	Pachytän, geteilter Nucleolus	Pachytän, normaler Nucleolus	Anzahl der ausgezählten PMZ
1	Basis	42,2	57,8				187
	Mitte	7,1	92,9				184
	Spitze		100,0				99
2	Basis		99,1	0,9			337
	Mitte		97,4	2,6			566
	Spitze		87,5	12,5			176
3	Basis		71,3	19,4	7,0	2,3	258
	Mitte		56,9	25,3	11,5	6,3	288
	Spitze		1,4	7,5	46,7	44,4	480
4	Basis		1,3	49,3	37,2	12,2	148
	Mitte		0,8	36,6	49,6	13,0	262
	Spitze			7,4	68,5	24,1	162
5	Basis			47,3	39,1	13,6	425
	Mitte			29,5	49,8	20,7	285
	Spitze			12,6	64,2	23,2	254
6	Basis			17,4	21,1	61,5	327
	Mitte			4,8	21,7	73,5	290
	Spitze			3,7	9,0	87,3	134
7	Basis		3,7	12,3	30,5	53,5	187
	Mitte		0,4	3,2	7,6	88,8	251
	Spitze			0,6	1,2	98,2	165
8	Basis		1,9	2,2	6,2	89,7	1047
	Mitte			0,2	4,2	95,6	1118
	Spitze				2,1	97,9	432
9	Basis				95,8	4,2	408
	Mitte				45,0	55,0	380
	Spitze				36,8	63,2	269
10	Basis				11,5	88,5	889
	Mitte				5,6	94,4	390
	Spitze				1,3	98,7	794
11	Basis				6,8	93,2	429
	Mitte				2,7	97,3	407
	Spitze				0,6	99,4	663
12	Basis				0,3	99,7	753
	Mitte					100,0	603
	Spitze					100,0	518
Gesamtzahl der ausgezählten PMZ							14565

tän und treten gerade in das Stadium der Nucleolenumformung ein. Die Basis zeigt nahezu durchgängig den normalen Nucleolus, doch schon im Mittelteil der Anthere tritt in 2,6% aller Kerne der „Ableger“ auf. In der Antherenspitze steigt der Anteil bereits auf 12,5% an. Der Umwandlungsprozeß beginnt also im Verlauf des Zygotäns, und da die Antherenspitze den tiefer gelegenen Regionen in der Entwicklung vorseilt, muß der geteilte Nucleolus in der Antherenspitze in größerer Häufigkeit auftreten als im Mittelteil und in der Basis.

In den folgenden Antheren sind Zygotän- und Pachytänkerne vorhanden. Die Antheren 3, 4 und 5 der Tabelle 2 stehen mitten im Umwandlungsprozeß ihrer Nucleolen, sie enthalten einen hohen Prozentsatz von PMZ mit dem geteilten Nucleolus. Betrachten wir die Anthere 4: In ihrer Basis befinden sich 50,6% aller PMZ im Zygotän, davon enthalten 49,3% den *geteilten* und nur 1,3% den *normalen* Nucleolus. Die vorhandenen Pachytänkerne der Antherenbasis (49,4%) zeigen ebenfalls zum überwiegenden Teil (37,2%) den *geteilten* Nucleolus, nur 12,2% aller Pachytänkerne der Antherenbasis sind in bezug auf ihren Nucleolus normal. In der Antherenspitze hingegen ist kein Zygotänkern mit normalem Nucleolus mehr vorhanden, auch die Pachytänkerne der Spitzenregion besitzen überwiegend *geteilte*

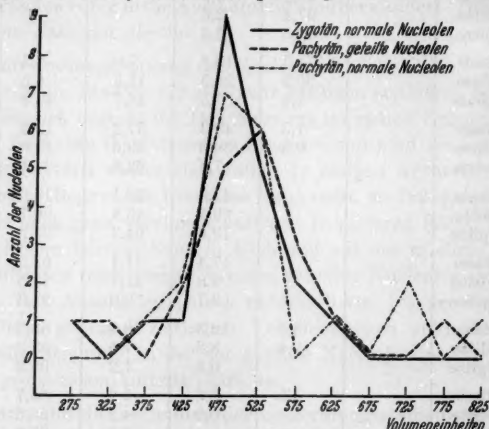


Abb. 6. Der Vergleich der Volumina von je 20 Nucleolen vor, während und nach dem Umwandlungsprozeß des Nucleolus in der meiotischen Prophase von *Solanum lycopersicum*.

Nucleolen. Der Anteil der Pachytänkerne mit *normalem* Nucleolus ist jedoch mit 24,1% gegenüber der Antherenbasis (12,2%) stark gestiegen. Der Unterschied zwischen Antherenspitze und Basis in der Spalte „Pachytän, normaler Nucleolus“ der Tabelle 2 läßt sich aber nur so interpretieren, daß die in den Pachytänkern dieser Anthere auftretenden normalen Nucleolen nicht *noch*, sondern *wieder* normal sind, ihren Umwandlungsprozeß also bereits durchlaufen haben. Nur bei dieser Deutung ist es verständlich, daß ihr Anteil in der Antherenspitze höher ist als in der Basis.

Die Antheren 10–12 der Tabelle 2 schließlich enthalten nur Pachytänkerne. Sie haben den Umwandlungsprozeß der Nucleolen im wesentlichen bereits durchschritten. Es läßt sich nur noch in ihrer Basis ein geringer Prozentsatz von PMZ mit dem geteilten Nucleolus nachweisen, während die Zellen der Antherenspitze nahezu ausschließlich wieder den normalen Nucleolus enthalten.

Wir müssen aus diesen Befunden schließen, daß der Nucleolus im frühen Zygotän normal ist, sich im späten Zygotän teilt, im frühen Pachytän noch geteilt ist und im Verlauf des Pachytäns wieder normal wird. Der zum Teil erheblich hohe prozentuale Anteil, in dem der geteilte Nucleolus in den PMZ von Zygotän-Pachytän-Antheren auftritt, macht

es sehr wahrscheinlich, daß der Umformungsprozeß des Nucleolus gesetzmäßig in allen PMZ der Antheren von *Solanum lycopersicum* abläuft.

Es wäre nun denkbar, daß der Nucleinsäure- oder Eiweißstoffwechsel des Kerns irgendwie in den Vorgang der Nucleolenumwandlung eingreift etwa in dem Sinne, daß durch neue Synthesen am „nucleolar organizing body“ Nucleolarsubstanz angelagert wird. Wäre dies der Fall, so wäre eine Volumenzunahme des Nucleolus zu erwarten. Wir sind dieser Frage an Hand von Nucleolenmessungen nachgegangen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abb. 6 graphisch dargestellt. Es sind die Volumina von je 20 Nucleolen vor, während und nach dem Umformungsprozeß in der meiotischen Prophase miteinander verglichen. Die variationsstatistische Auswertung der Messungen bestätigt das Kurvenbild: Die Volumina der normalen Nucleolen vor und nach dem Umformungsprozeß sind — innerhalb ihrer natürlichen Streuung — gleich und entsprechen den Volumina der geteilten Nucleolen. Das besagt aber, daß das vorliegende Phänomen tatsächlich nur ein Umformungsprozeß ist, bei dem Substanz weder verloren geht noch neu gebildet wird.

3. Der Formwechsel der Nucleolen in den späteren meiotischen Stadien.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Oenothera* (MARQUARDT 1937) bleibt in den PMZ von *Solanum lycopersicum* die Verbindung zwischen Satellitenbivalent und Nucleolus bis zur Kerneröffnung bestehen. Der Prozeß der Auflösung selbst kann nur selten beobachtet werden; er muß sehr rasch ablaufen. Der Abbau des Nucleolus wird dadurch eingeleitet, daß der bis dahin streng gewährte räumliche Zusammenhang von SAT-Bivalent und Nucleolus aufgegeben wird. Gleichzeitig verliert der Nucleolus stark an Farbspeicherungsvermögen, wird kleiner und verschwindet. Ein „Zerstäuben“ des Nucleolus, wie es für *Oenothera* und andere Objekte mehrfach beschrieben worden ist und bei *Physalis* sehr gut beobachtet werden kann, ist bei *Solanum lycopersicum* nicht nachweisbar.

In der ersten und zweiten Interphase werden je Kern anfänglich 3—4 Nucleolen gebildet, die aber sehr rasch auf zunächst zwei reduziert werden. Ältere Gonen, die kurz vor der Pollenmitose stehen, enthalten nur noch einen Nucleolus. Da die Dyaden- und Tetradenkerne haploid sind, also nur ein Satellitenchromosom enthalten, müssen — unter der Voraussetzung, daß die Fähigkeit zur Nucleolenbildung nur spezifischen Loci bestimmter Chromosomen zukommt — noch andere Chromosomen des Genoms diese Fähigkeit besitzen. Das gilt auch für die Annahme, daß *Solanum lycopersicum* möglicherweise eine phylogenetisch tetraploide Form ist (GOTTSCALK 1951), in diesem Fall kann nur die Bildung von 2 Nucleolen durch die Satellitenchromosomen erklärt werden.

Die Reduktion der Nucleolenzahl in der ersten und zweiten Interphase muß nicht unbedingt durch echte Verschmelzungsvorgänge erfolgen. Es lassen sich vielmehr unter den anfangs gleichgroßen Nucleolen Volumenveränderungen beobachten, ohne daß es zu einer räumlichen Annäherung der Kernkörperchen kommt. Der Volumenabnahme einiger Nucleolen läuft eine Volumenzunahme eines bestimmten Nucleolus parallel, der sich durch seine gesetzmäßige Lagebeziehung zu einem besonders großen, tief gefärbten Chromozentrum, dem Satelliten des SAT-Chromosoms, als der bleibende Nucleolus kenntlich macht. Es hat also den Anschein, als seien die anfänglich vorhandenen 4 Nucleolen nicht gleichwertig, einige von ihnen scheinen sich in der Karyolymphe aufzulösen, die dadurch freiwerdende Nucleolarsubstanz wird vom bleibenden Nucleolus resorbiert.

Der Formwechsel des Nucleolus im Verlauf der Meiosis läßt sich durch schädigende Einflüsse auf die PMZ stören. So lassen sich nach Röntgen- und Chemikalienbehandlung gewisse zeitliche Verschiebungen des Umformungsprozesses in der meiotischen Prophase beobachten. Der geteilte Nucleolus kann in derartig behandelten Pflanzen noch in der Diakinese vorhanden sein. Nach Röntgenbestrahlung kommt es vor, daß der Nucleolus im Verlauf der Kerneröffnung überhaupt nicht aufgelöst wird, sich vielmehr in 2 oder 3 Körperchen teilt, die nicht mit in die Tochterkerne einbezogen werden und bis zur zweiten Interphase erhalten bleiben. Unabhängig davon verläuft die Neubildung der Nucleolen in den Dyaden- und Tetradenkernen völlig normal. Die Synthese neuer Nucleolarsubstanz wird vom Kernstoffwechsel anscheinend im Bedarfsfalle ohne Schwierigkeiten zustande gebracht. Es handelt sich bei diesem Vorgang nicht um einen spezifischen Röntgeneffekt, die gleichen Beobachtungen wurden von LINNERT (1949) in unbehandelten PMZ von *Digitalis* gemacht.

4. Die Verbreitung des Umwandlungsprozesses in der Gattung *Solanum* und in anderen Gattungen der Familie der *Solanaceen*.

Das oben beschriebene Verhalten der Nucleolen in der meiotischen Prophase von *Solanum lycopersicum* weicht so auffallend vom Normalverhalten der Nucleolen anderer Objekte ab, daß es angebracht erschien, die näheren und weiteren Verwandten von *Solanum lycopersicum* hinsichtlich ihres Nucleolenverhaltens zu untersuchen. Ein großer Teil der aufgezogenen *Solanum*-Arten enthält in den fraglichen Entwicklungsstadien der meiotischen Prophase den geteilten Nucleolus in der gleichen Weise wie *Solanum lycopersicum*. Es gilt dies für die Arten *Solanum alatum* (= *miniatum*), *Boerhavia*, *chacoense*, *dulcamara*, *nodiflorum* (= *Guineense*), *gracile*, *globuliferum*, *luteum* (= *villosum*), *nigrum*, *rostratum*,

Seasforthianum und *tuberosum*. In einer Reihe weiterer *Solanum*-Arten tritt wohl der geteilte Nucleolus in Pachytänkernen auf, aber so selten, daß er hier ohne Zweifel nur noch ein Ausnahmefall ist und nicht mehr in allen PMZ der Anthere gesetzmäßig gebildet wird. In diese Gruppe gehören die Arten *Solanum citrullifolium* (= *heterodoxum*), *Gilo*, *Humboldtii*, *pyracanthum*, *racemigerum*, *triflorum* und *sisymbriifolium*. In einer dritten Gruppe von *Solanum*-Arten schließlich haben wir den geteilten Nucleolus in der meiotischen Prophase nicht nachweisen können (*Solanum Caldesii*, *pimpinellifolium*, *Tomatillo*). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Untersuchung einiger anderer Gattungen der Familie der *Solanaceen*. In der Gattung *Physalis* tritt der geteilte Nucleolus in großer Anzahl in den Arten *Ph. Alkekengi*, *Peruviana* und *Franchetti* auf. Der Umformungsprozeß ist hier gegenüber *Solanum lycopersicum* zeitlich etwas vorverlegt und erreicht sein extremstes Stadium bereits im späten Zygotän. Das gleiche gilt für *Nicandra physaloides*. In der meiotischen Prophase von *Capsicum annuum* wurden ebenfalls — jedoch in sehr geringer Anzahl — geteilte Nucleolen gefunden, während sie bei *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium*, *Nicotiana Sanderae* und *Atropa belladonna* nicht nachgewiesen werden konnten.

D. Theoretischer Teil.

1. Der Mechanismus der Nucleolenverschmelzung.

Die Untersuchung der letzten prämeiotischen Telophasen von *Solanum lycopersicum* haben ergeben, daß in der überwiegenden Anzahl aller Kerne jedes der beiden vorhandenen Satellitenchromosomen einen eigenen Nucleolus bildet, daß aber bereits in den prämeiotischen Ruhekernen nahezu durchgängig nur noch ein einziger Nucleolus vorhanden ist. Es muß also im Verlauf der Bildung des prämeiotischen Ruhekerns eine Nucleolenverschmelzung zustande kommen. Dem eigentlichen Verschmelzungsprozeß muß zunächst ein Bewegungsvorgang der im Kernraum stets getrennt voneinander entstehenden Nucleolen vorausgehen. Es soll zunächst die Frage nach den Kräften, die für die räumliche Annäherung der beiden Nucleolen verantwortlich sind, diskutiert werden.

Theoretisch sind zwei Möglichkeiten gegeben. Es kann die Initiative zum Bewegungsvorgang von den beiden Nucleolen ausgehen. Diese Annahme kann bei der relativ geringen Kenntnis, die wir vom Wesen des Nucleolus besitzen, nicht durch konkrete Beobachtungen gestützt werden. Theoretisch kann die räumliche Annäherung der beiden Nucleolen aber ebensogut von den beiden Satellitenchromosomen ausgehen. Die SAT-Chromosomen sind Homologe, und die Parallelkonjugation der Homologen würde im Zygotän oder Pachytän ohnehin die Verschmelzung der beiden Nucleolen herbeiführen. Die cytologische Untersuchung von

Objekten mit partiell heterochromatischen Chromosomen hat aber schon mehrfach erwiesen, daß das Heterochromatin in der Parallelkonjugation dem Euchromatin vorausseilen kann (MARQUARDT 1937, LINNERT 1949). Die Satelliten der Nucleolenchromosomen sind aber besonders stark heterochromatisch, und es ist durchaus möglich, daß sich diese verstärkte Heterochromasie der Satelliten in der Weise auswirkt, daß eine Konjugation dieser Chromosomenregionen nicht erst im Zygotän, sondern bereits im Verlaufe der Bildung des prämeiotischen Ruhekerns angestrebt wird. Dabei kommt zunächst eine räumliche Annäherung der beiden Nucleolen zustande, die bei ihrer Berührung zur Verschmelzung führt. Im Stadium der beginnenden Verschmelzung kann die vollständige Konjugation der beiden Satelliten noch nicht vollzogen sein, weil die Größe der Nucleolen rein räumlich die weitere Annäherung der Satelliten zunächst noch verhindert, wir werden also in diesem Stadium keine lagemäßige Beziehung der beiden Satelliten zueinander am bereits verschmolzenen Nucleolus erwarten. Nach der Nucleolenverschmelzung setzen die Satelliten ihre Paarungsbestrebungen fort und konjugieren zunehmen. In der Tat finden sich am Nucleolus des prämeiotischen Ruhekerns in der Regel 2 eng benachbarte, tief gefärbte Chromozentren: die heterochromatischen Segmente der bereits konjugierten SAT-Chromosomen. In anderen Ruhekernen hingegen liegen jeweils 2 Chromozentren nicht konjugiert, sondern anscheinend zufällig am Nucleolus, wir halten sie für die heterochromatischen Segmente der noch nicht ganz konjugierten Satellitenchromosomen kurz nach der Nucleolenverschmelzung.

Die Tatsache, daß fusionierende Nucleolen nur äußerst selten angetroffen werden, deutet darauf hin, daß sowohl der Bewegungs- als auch der eigentliche Verschmelzungsprozeß zwei sehr rasch ablaufende Vorgänge sind. Dies geht auch aus einem Befund von ZICKEL (unveröffentlicht) hervor, die die Verschmelzung zweier Nucleolen bei *Sedum spectabile* in vivo beobachten konnte; sie lief in 4 min ab. Die Annahme, daß die Nucleolenverschmelzung durch die Paarungstendenz der beiden Satelliten eingeleitet wird, wird durch einen Befund von LINNERT (1949) an *Digitalis* gestützt: dort sind die heterochromatischen Chromosomensegmente der Satellitenchromosomen bereits im prämeiotischen Ruhekern gepaart, während die Parallelkonjugation aller anderen Chromosomen völlig normal im Zygotän beginnt und im Pachytän abgeschlossen ist.

2. Der Umwandlungsprozeß der Nucleolen im Pachytän.

Im empirischen Teil ist gezeigt worden, daß in vielen Zygotän- und Pachytänkernen zwei teils gleich-, teils verschieden große Nucleolen in enger Berührung vorhanden sind. Eine naheliegende Deutung dieser für *Solanum lycopersicum* äußerst charakteristischen Figuren wäre

folgende: Die beiden in der letzten prämeiotischen Telophase getrennt entstandenen Nucleolen sind aus irgendwelchen Gründen beide erhalten geblieben und haben die frühesten meiotischen Stadien unverändert überdauert. Da ihre Bildungszentren an den gleichen Orten der homologen Satellitenchromosomen liegen, muß bei der Parallelkonjugation dieser beiden Chromosomen während des Zygotäns ganz zwangsläufig eine räumliche Annäherung der beiden Nucleolen erfolgen, die nach vollzogener Konjugation zu den oben beschriebenen Figuren führt. Die Größenunterschiede, die sich häufig zwischen den beiden banachbarten Nucleolen feststellen lassen, kommen einfach dadurch zustande, daß nunmehr eine Verschmelzung der beiden Nucleolen vor sich geht und daß die unterschiedlich großen Nucleolen verschiedene Stadien des Verschmelzungsvorgangs verkörpern. Mit vollzogener Verschmelzung ist schließlich gegen Ende des Pachytäns der endgültige Normalzustand dieser vorher abweichenden PMZ hergestellt, indem in allen Kernen nunmehr durchgängig nur noch ein Nucleolus vorhanden ist. Einen derartigen Fall beschreibt ERNST (1938) für *Antirrhinum*. Hier finden sich im Ruhekern und noch in 11,5% aller Zygotänkerne 2 Nucleolen, deren Verschmelzung im Pachytän beobachtet werden kann.

Ohne Zweifel liegt in der meiotischen Prophase von *Solanum lycopersicum* ein Phänomen vor, das durch diese Interpretation nicht erklärt werden kann. Es läßt sich zunächst im Verlauf der Bildung des prämeiotischen Ruhekerns der gleiche Verschmelzungsvorgang beobachten, den ERNST für *Antirrhinum* beschrieben hat. Die in der meiotischen Prophase von *Solanum lycopersicum* vorgefundenen 2 Nucleolen je Kern treten jedoch erst nach diesem Verschmelzungsvorgang auf, sie müssen also aus dem im späten Leptotän in allen Kernen vorhandenen normalen Nucleolus in irgendeiner Weise neu entstanden sein. OHLENDORF (1944) hat das gleiche Phänomen bei *Solanum lycopersicum* beobachtet. Sie nimmt an, die beiden Satellitenchromosomen schnürten im Verlauf ihrer Konjugation den Nucleolus ein und brächten dadurch jenen Körper zustande. Wäre dies die Ursache, so müßte man bei der Durchsicht einer größeren Anzahl von Kernen einmal den Beginn dieser Einschnürung sehen; das ist aber nie der Fall. Es hat sich im Gegenteil erwiesen, daß die Substanzbrücke, die die beiden Körper miteinander verbindet, stets annähernd den gleichen Durchmesser besitzt, ohne Rücksicht darauf, ob die beiden Nucleolen gleich- oder verschieden groß sind.

In der Literatur finden sich einige Fälle, in denen der Nucleolus in einer Weise vom Normalverhalten abweicht, die wenigstens morphologisch gewisse Ähnlichkeiten mit dem bei *Solanum lycopersicum* beobachteten Phänomen der Nucleolenumformung aufweist. LINDBAUER (1932) beobachtet an lebenden Nucleolen von *Mesembryanthemum* Einschnürungen, die aber innerhalb von etwa 15 min zu vollständiger Durch-

schnürung führen. Auch die „Nucleolarknospen“, die RESENDE (1940a) in der meiotischen Prophase von *Anthirrhinum* findet, haben wohl rein morphologisch eine gewisse Ähnlichkeit mit dem geteilten Nucleolus von *Solanum lycopersicum*, sie kommen aber dadurch zustande, daß eine gewisse, nicht näher definierte Substanz im Laufe der meiotischen Prophase auf den Nucleolus aufgelagert, also nicht von ihm abgesondert wird. In einer Arbeit von MCCLINTOCK (1934) sind Körper photographiert und beschrieben, die morphologisch mit dem geteilten Nucleolus von *Solanum lycopersicum* weitgehend übereinstimmen. Ihre Ursache liegt jedoch in einer reziproken Translokation, an der das Satellitenchromosom des Genoms beteiligt ist. Der Bruch liegt genau im „nucleolar organizing body“. Die Rekombination bringt 2 translozierte Chromosomen zustande, von denen jedes einen verschiedenen großen Teil des nucleolenbildenden Segmentes besitzt; beide Chromosomen sind daher befähigt, einen Nucleolus zu bilden. Im Pachytän kommt eine Kreuzkonjugation zustande, deren Translokationspunkt in den Bildungszentren der Nucleolen liegt. Die Folge davon ist eine Aneinanderlagerung der beiden Nucleolen, die dadurch eine große Ähnlichkeit mit den bei *Solanum lycopersicum* vorgefundenen Körpern haben.

Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Beobachtungen an anderen Objekten hat sich für *Solanum lycopersicum* nachweisen lassen, daß das vorliegende Phänomen mit einem echten Umformungsprozeß des Nucleolus in Zusammenhang steht. Es handelt sich dabei um ein Ausreten von Nucleolarsubstanz durch eine Konjugationslücke der beiden gepaarten Satellitenchromosomen hindurch. Die Tatsache, daß diese Konjugationslücke stets in der gleichen, eng begrenzten Region des Bivalents zustande kommt, deutet darauf hin, daß gewisse physiologische Beziehungen zwischen dem Nucleolus und dieser Chromosomenregion bestehen. Die Einleitung des Umformungsprozesses geht offenbar vom SAT-Bivalent aus. Da sie in allen Kernen mit großer Präzision zum gleichen Zeitpunkt einsetzt, muß zu diesem Zeitpunkt, also im mittleren Zygotän, eine für *Solanum lycopersicum* spezifische kernphysiologische Konstellation wirksam werden, auf die 2 eng begrenzte Regionen im Heterochromatin des Satellitenbivalents in der Weise reagieren, daß sie ihre bereits vollzogene Konjugation rückgängig machen. Durch eine physiologische Wechselwirkung zwischen dieser Region und dem angrenzenden Bezirk des Nucleolus erfolgt dann — möglicherweise unter Einschaltung einer lokalen Verminderung der Oberflächenspannung — der Austritt von Nucleolarsubstanz. Der ganze Umformungsprozeß kommt offenbar durch ein aktives Zusammenwirken von Satellitenbivalent und Nucleolus zustande. Da sich das Volumen des Nucleolus dabei nicht verändert, scheint weder der Nucleinsäure- noch der Eiweißstoffwechsel des Kerns in den Vorgang eingeschaltet zu sein.

Die Deutung dieses Phänomens wird noch komplizierter durch die Tatsache, daß der Umwandlungsprozeß nicht auf die Art *Solanum lycopersicum* beschränkt ist. Er läßt sich für eine größere Anzahl anderer *Solanum*-Arten nachweisen. Merkwürdigerweise tritt er aber in einer Reihe von Arten, die in ihrem Habitus der Species *Solanum lycopersicum* sehr ähneln (z. B. *S. racemigerum*, *S. pimpinellifolium*, *S. triflorum*), nicht auf, findet sich hingegen in einigen — wiederum nicht in allen untersuchten — anderen Gattungen der Familie der *Solanaceen*. Da eine phyletische Entstehung des Phänomens wohl nicht in Erwägung gezogen werden kann, läßt sich das unterschiedliche Auftreten des geteilten Nucleolus nur so erklären, daß der Umwandlungsprozeß stammesgeschichtlich schon sehr frühzeitig zustande gekommen und im Verlauf der phylogenetischen Weiterentwicklung in einigen Gattungen und Arten der Familie der *Solanaceen* sekundär wieder verlorengegangen ist.

Zusammenfassung.

1. Untersuchungen über das Ausreifen der Pollensäcke erbringen für *Solanum lycopersicum* den Nachweis, daß die Pollenmutterzellen der Antherenspitze als erste in die Meiosis eintreten und während des gesamten meiotischen Stadienablaufs einen deutlichen Entwicklungsvorsprung gegenüber den tiefer gelegenen Pollenmutterzellen der Anthere beibehalten.

2. Es wird das Verhalten der Nucleolen von *Solanum lycopersicum* während der Meiosis untersucht. Dabei läßt sich nachweisen, daß in sämtlichen Pollenmutterzellen während des Zygotäns und Pachytäns ein Umwandlungsprozeß des Nucleolus abläuft, der in seinem extremsten Stadium zu einem geteilten Nucleolus aus 2 gleichgestalteten Hälften führt und im Verlauf des Pachytäns den Normalzustand wieder erreicht. Während dieses Umformungsprozesses geht weder Substanz verloren noch wird solche neu gebildet.

3. In der ersten und zweiten Interphase werden in den haploiden Kernen anfänglich 3—4 Nucleolen gebildet, es müssen also außer dem Satellitenchromosom noch andere Chromosomen des Genoms zur Nucleolenbildung befähigt sein.

4. In röntgenbestrahlten Pollenmutterzellen kann die Auflösung der Nucleolen unterbleiben. Die Neubildung der Nucleolen läuft in den Dyaden- und Tetradenkernen dieser Zellen trotzdem normal ab.

5. Die Untersuchung von 22 *Solanum*-Arten erbrachte für 12 Species im Hinblick auf den Umwandlungsprozeß des Nucleolus die gleichen Verhältnisse wie für *Solanum lycopersicum*, dasselbe gilt für 3 Arten der Gattung *Physalis* und für *Nicandra physaloides*. In einer Reihe weiterer *Solanum*-Arten sowie in den Gattungen *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus* und *Nicotiana* konnte in den untersuchten Arten

der geteilte Nucleolus in der meiotischen Prophase entweder nur in sehr wenigen Pollenmutterzellen oder gar nicht nachgewiesen werden.

Literatur.

- ERNST, H.: Meiosis und crossing-over. Z. Bot. **33**, 241—294 (1938). — GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Wien: Springer 1949. — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. Chromosoma **4**, 298—341 (1951). — LINNERT, G.: Untersuchungen über die Cytologie polyploider Pflanzen. II. Chromosoma **3**, 399—419 (1949). — LINSBAUER, K.: Zit. nach TISCHLER 1934. — MARQUARDT, H.: Die Meiosis von *Oenothera*. Z. Zellforsch. **27**, 159—210, (1937). — MCCLINTOCK, B.: The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. Z. Zellforsch. **21**, 294—328 (1934). — OHLENDORF, A.: Untersuchungen zur Zytologie und Physiologie der Meiosis von *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum*. Diss. Freiburg 1944. — RESENDE, E.: Die Nucleolen bei *Antirrhinum majus* L. Ber. dtsch. bot. Ges. **58**, 460—470 (1940). — TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie (Kap. Die Morphologie der Nucleolen). In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II, 1. Hälfte, S. 138—163. 1934.

Dr. WERNER GOTTSCHALK, Darmstadt-Eberstadt, Mühlthalstr. 50.

Aus dem Institut für allgemeine Biologie der Universität Wien.

DIE VERBREITUNG VON CHROMOSOMENDISLOKATIONEN
IN NATÜRLICHEN POPULATIONEN VON *LIRIOMYZA*
UROPHORINA MIK.

Von

F. MAINX.

Mit 2 Textabbildungen und 1 Tafel.

(Eingegangen am 19. Mai 1951.)

Liriomyza urophorina MIK ist eine Agromyzide, deren Larven in den Blütenknospen von *Lilium martagon* parasitieren. Gelegentlich sollen sie auch bei *Lilium candidum* in Gartenkultur vorkommen (Ross 1927). J. MIK (1894) gibt eine treffende Beschreibung der Art und ihrer Lebensweise. Das Männchen, das MIK nicht gesehen hat, hat die gleiche Größe und Färbung wie das Weibchen, sein Geschlechtsapparat hat die für die Gruppe charakteristischen Merkmale. Ich habe die Lebensweise der Fliege durch mehrere Jahre beobachtet und kann der Beschreibung von MIK das Folgende hinzufügen. Die Imago schwärmt im Frühjahr, während an der Wirtspflanze die jungen Knospenanlagen sichtbar werden. In die junge Knospe legt das Weibchen bis zu 10 Eier, die Larve entwickelt sich, während die Knospe heranwächst. An den befallenen Knospen sieht man noch später die Einstichstellen des Legestachels in Form von bräunlich verfärbten Narben. Die stärker befallenen Knospen blühen nicht auf. Ihr Inhalt ist durch die Fraßstätigkeit der Larven so stark verklebt, daß die beim Aufblühen entstehende Gewebespannung die Perigonblätter nicht zu entfalten vermag, sondern zu ihrer Ablösung am Grunde führt. Aus den abgefallenen Knospen brechen die Larven sehr bald aus, andere verlassen die Knospen schon vorher oder werden beim Aufblühen frei. Die Verpuppung erfolgt in der Natur knapp unter der Erdoberfläche, nachdem sich die Larven eine Zeitlang durch Kriechen und Springen fortbewegt haben. Die Puppenruhe dauert normalerweise bis zum nächsten Frühjahr. Es ist eine seltene Ausnahme, wenn schon im gleichen Herbst eine Imago schlüpft, wie es MIK beobachtet hat. Der einjährige Zyklus ist durch die Puppenruhe so streng geregelt, daß nach meinen wiederholten Erfahrungen sowohl im Laboratorium bei Zimmertemperatur als auch in einem feuchten, kühlen Keller aufbewahrte Puppen zur gleichen Zeit schlüpfen, als die Wirtspflanze in der Natur im richtigen Stadium war.

Liriomyza urophorina ist in den mir bekannten Teilen Österreichs weit verbreitet und tritt überall häufig auf, wo *Lilium martagon* in dichteren Beständen vorkommt. Der Befall ist oft so stark, daß kaum eine

Blüte frei von Parasiten ist und daß nur wenige oder keine Blüte der Infloreszenz normal aufblühen. Wo die Bestände der Wirtspflanze schütter und nicht zusammenhängend sind, ist der Parasit seltener und fehlt meist ganz in Gebieten, in denen die Pflanze nur vereinzelt vorkommt. Auch in den Kulturen der Pflanze in städtischen Gärten fehlt er ganz. Der Parasit geht fast niemals über 1000 m Seehöhe hinauf. Die höchstgelegenen Standorte mit geringem Befall konnte ich am Obersee bei Lunz (Niederösterreich) in 1117 m Höhe und im Gebiet des Großen Göller (Niederösterreich) in 1200 m Höhe feststellen. Höhergelegene Standorte sind völlig frei von Parasiten, auch dann, wenn *Lilium martagon* dichte, geschlossene Bestände bildet, wie z. B. im Gebiet von Apriach bei Heiligenblut (Kärnten) auf Almiesen in 1400 bis 1600 m Höhe und am Scheiblingstein bei Lunz a. See in 1300—1500 m Höhe. In diesen Höhen blüht *Lilium martagon* erst Ende Juli oder Anfang August, während im Hügelland und Mittelgebirge die Blütezeit sich von Ende Mai bis Ende Juni erstreckt. Es ist dem Parasiten offenbar nicht gelungen, seine Periodizität so weit zu verschieben oder sich den anderen Überwinterungsbedingungen im Hochgebirge anzupassen, in das seine Wirtspflanze wahrscheinlich erst sekundär eingedrungen ist. Diese hohen Lagen ausgenommen folgt die Verbreitung von *Liriomyza* vollkommen der Verbreitung der Wirtspflanze.

Lilium martagon ist in Österreich im allgemeinen häufig in Laub- und Mischwäldern und in Gebüsch, aber auch auf Schlägen und Wiesen des Hügellandes und des Mittel- bis Hochgebirges. Da es kalkhaltigen Boden bevorzugt, ist es besonders häufig im nördlichen und südlichen Kalkalpenzug bis in die Krummholzregion. Die Pflanze kommt aber auch über Urgestein in den Zentralalpen und im Mühlviertel allenthalben vor. Sie steigt stellenweise bis 2300 m Höhe auf. *Lilium martagon* ist auch sonst in Europa weit verbreitet, fehlt aber in Großbritannien, Belgien, Holland, Dänemark, Skandinavien, dem nordwestdeutschen Flachland, der ungarischen Tiefebene und im immergrünen Mittelmeergebiet. Nach Ansicht der Pflanzengeographen ist es mit der Fichte aus Sibirien in Mitteleuropa eingewandert. Die Besiedlung des Laubwaldes durch diese Pflanze ist also sekundär. Über das Vorkommen von *Liriomyza urophorina* außerhalb Österreichs ist nichts bekannt, doch ist anzunehmen, daß der Parasit in seiner strengen Bindung an seine Wirtspflanze diese überall dort begleitet, wo sie in geschlossenen Verbänden vorkommt. Daß die Pflanze in manchen an sich ökologisch günstigen Gebieten Österreichs fehlt oder nur vereinzelt vorkommt, dürfte auf die Nachstellungen des Menschen zurückgehen und dies dürfte in anderen Ländern in noch höherem Maß gelten.

Im Sommer 1948 fand ich in einer natürlichen Population von *Liriomyza* im Wiener Wald eine Reihe von Inversionen bei der Unter-

suchung der Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen der Larven, über die ich vorläufig berichtet habe (MAINX 1949). Für Riesenchromosomenuntersuchungen stellen diese Larven ein ungemein günstiges Objekt dar. Sie sind leicht zu präparieren, die Riesenchromosomen der verpuppungsreifen Larven sind groß und sehr klar in ihrer Struktur. Für eine eingehendere Untersuchung der Verteilung von Dislokationen in natürlichen Populationen empfiehlt sich dieses Objekt aber vor allem aus einem anderen Grund. Die Bedeutung solcher Dislokationen für Rassen- und Artbildungsfragen hat die Populationsgenetik in den letzten Jahren in steigendem Maß beschäftigt, eine Reihe von Experimentalarbeiten und von theoretischen Untersuchungen wurden diesen Fragen gewidmet (letzte Zusammenstellungen s. MÜLLER 1940 und MAINX 1950). Populationsstatistische Untersuchungen über die Verteilung von Dislokationen wurden nun meist mit *Drosophila*-Arten durchgeführt. Die Populationen dieser Fliege sind in ihren statistischen Eigenschaften vor allem durch die folgenden Momente bestimmt. Die Populationsgröße, d. h. die Individuenzahl N in der Population schwankt nach den lokal bedingten Unterschieden in den Lebensbedingungen in mehr oder weniger weiten Grenzen, sie ist aber vor allem starken saisonbedingten Schwankungen ausgesetzt. Die während eines Jahres aufeinanderfolgenden Generationen sind an Zahl, vor allem aber an Individuenzahl sehr verschieden groß und in den gemäßigten Zonen bedeutet der Winter eine einschneidende Reduktion der Populationsgröße auf eine ganz geringe Zahl überwinternder Individuen. Durch die Flugfähigkeit der Tiere und das aktive Aufsuchen günstiger Standorte sind gewisse Verschiebungen durch Migration möglich. Alle diese Eigentümlichkeiten bedingen es, daß für die Verteilung der genischen und der strukturellen Mannigfaltigkeit und für die Herstellung oder Störung von Gleichgewichten in ihrer Verteilung bei *Drosophila*-Populationen neben dem Selektions- und dem Mutationsdruck — und vielfach vielleicht gegen diesen — die rein statistischen Schwankungen eine relativ größere Rolle spielen dürften. Bei *Liriomyza* liegen die Verhältnisse anders. Es wird nur eine Generation im Jahr gebildet, so daß das Tempo der Evolutionsvorgänge gegenüber *Drosophila* verlangsamt ist. Die Populationsgröße ist gegenüber *Drosophila* sicher nur ganz geringen Schwankungen ausgesetzt. Die durch die relativ stabilen Vegetationsverhältnisse der perennierenden Wirtspflanze gegebenen Lebensbedingungen sind in den aufeinanderfolgenden Jahren stets die gleichen. Durch diese Gegebenheiten ist die Populationsgröße des Parasiten nach oben limitiert. Ungünstige Witterungsverhältnisse während der Flugzeit der Imagines oder während der Überwinterung der Puppen dürften wohl nur selten zu einer stärkeren Reduktion der Populationsgröße führen. Die Fliegen zeigen nur geringe Neigung zum Fliegen und scheinen stets

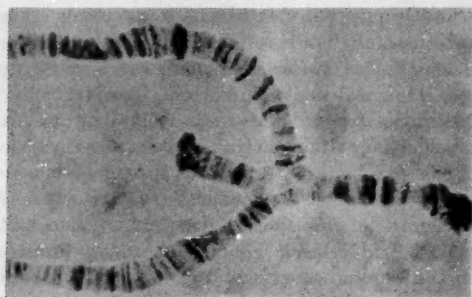
wieder die gleiche Wirtspflanzenpopulation zu befallen, an der schon ihre Eltern gelebt haben. Diese statistisch weitgehend stabilen Populationsverhältnisse lassen es erwarten, daß für die Verteilung der strukturellen Mannigfaltigkeit und für die Aufrechterhaltung von Gleichgewichtszuständen weniger zufällige statistische Schwankungen maßgeblich sind, als vielmehr der Selektionswert, der den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der strukturell verschiedenen Chromosomen zukommt. Aus diesen Gründen wurden in den Jahren 1949 und 1950 die Populationen von *Liriomyza* an verschiedenen Standorten in Österreich vergleichend auf ihren Gehalt an Dislokationen untersucht. Die bisherigen Ergebnisse, die hier vorgelegt werden, sollen in den folgenden Jahren durch die Untersuchung weiterer Standorte ergänzt werden. Es wäre sehr zu wünschen, daß auch Populationen in anderen Ländern untersucht würden, um das weite Verbreitungsgebiet, das dieser Parasit wahrscheinlich im Anschluß an seine Wirtspflanze hat, übersichtlich erfassen zu können. Da das lebende Material auf weitere Strecken nicht versandt werden kann, müßten diese Untersuchungen an Ort und Stelle erfolgen.

Zur Präparation der Speicheldrüsen wurden in der Regel nur Larven verwendet, die von selbst aus den Knospen oder Blüten der knapp vor dem Aufblühen gesammelten Pflanzen ausgebrochen und daher verpuppungsreif waren. Jüngere Larven, die man den Knospen entnommen hat, haben dünnere und schlechter färbbare Riesenchromosomen in ihren Speicheldrüsen. Die Riesenchromosomen im Epithel der Magenblindsäcke reifer Larven sind fast ebenso schön wie die in den Speicheldrüsen, während sie in den Malpighigefäßen, im Darmepithel und im Fettkörper sehr dünn, schlecht färbbar und für die Untersuchung nicht zu empfehlen sind. Vor der letzten Larvenhäutung sind auch die Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen von dieser ungünstigen Beschaffenheit. Solange die Puppenhülle noch sehr hell und nicht ganz erhärtet ist, lassen sich auch die Speicheldrüsen der Vorpuppe noch mit Erfolg präparieren. Die Präparation erfolgt in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung durch scharfes Abschneiden des Kopfteils knapp hinter den Schlundhaken und Ausdrücken des gesamten Körperinhalts mittels einer Nadel. Die Speicheldrüsen hängen mit ihrem kurzen gemeinsamen Ausführungsgang zusammen und zeigen sich als 1,5–2mal körperlange, ein- bis mehrfach umgeschlagene Schläuche von gleichmäßiger Dicke. Sie bestehen aus großen, alternierend angeordneten, durchsichtigen Zellen, die zwischen sich ein enges, in allen Teilen meist gleichmäßiges Lumen einschließen. Die Drüsen hängen vielfach lose mit dem Fettkörper zusammen, der eine große Zahl stark lichtbrechender, harter Körnchen erkennen läßt. Diese bestehen aus ätherischen Ölen und Harzen, die aus den verzehrten Pflanzenteilen stammen und im Fettkörper, der als Speicherniere fungiert, abgelagert werden. Die Speicheldrüsen werden mit Hilfe von zwei Nadeln von den übrigen Organen getrennt und in einen Tropfen Essigorcein (2% Orcein in 60% Eisessig) übertragen. Nach 5–10 min Färbung werden unter leichtem Klopfen nach der bei *Drosophila* üblichen Methode Dauerpräparate hergestellt.

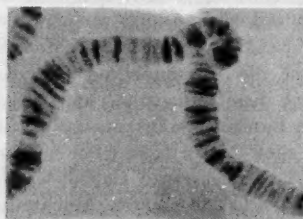
Liriomyza urophorina zeigt 6 Riesenchromosomenelemente, fünf längere und ein sehr kurzes. Diese entsprechen 5 akrozentrischen und

einem kleinen, kugelförmigen Chromosomenpaar in den somatischen Metaphasen. In der Chromosomenkarte (Tafel I) sind diese Elemente, nach abnehmender Länge geordnet, mit I—VI numeriert. Die 6 Elemente hängen in einem nur sehr schwach ausgebildeten Chromozentrum mit ihren proximalen Enden (in der Karte rechts) nur locker zusammen. Bei der Präparation wird dieser Zusammenhang fast stets vollkommen getrennt, so daß die Chromosomen einzeln im Präparat liegen und höchstens durch ihre Gruppierung als zu einem Kern gehörig erkannt werden können. Nur selten erhalten sich feine fädige Verbindungen zwischen den proximalen Enden zweier Chromosomen, am häufigsten noch zwischen dem III- und dem IV-Chromosom. Der Nukleolus mißt etwa $\frac{1}{3}$ des Kerndurchmessers, ist in den Speicheldrüsen nur sehr schwach, im Darmepithel etwas stärker färbbar und enthält ein kleines, stärker chromatinisiertes Zentrum, das hie und da mit einem feinen Faden mit dem Chromozentrum in Verbindung bleibt. Eine andere Verbindung oder Lagebeziehung des Nukleolus zu den Chromosomen läßt sich nicht feststellen. Interkalare Nukleolusbildner sind an den Chromosomen nicht ausgebildet. Die Chromosomen sind schon in ihrer natürlichen Lage im Speicheldrüsenkern nur wenig geknäult und strecken sich bei der Präparation in sehr befriedigender Weise. Die Untersuchung ihres Feinbaues ist daher viel leichter und rascher durchzuführen als bei *Drosophila*. Die Bandscheibenstruktur der Chromosomen ist sehr klar, deutlich und konstant, die Ausprägung der einzelnen Bandscheiben ist etwas variabel, je nach dem Reifezustand und nach dem physiologischen Zustand der Larven. Besonders konstante und für die Wiedererkennung brauchbare Marken sind die häufigen „Doubletten“, die an manchen Stellen als breite, stark konturierte Gebilde entwickelt sind. Neben vielen, in ihrer Form sehr konstanten Abschnitten gibt es in allen Chromosomen Partien, die „Puff“-artig gequollen sein können. In ihnen erscheinen dann die Bandscheiben verdünnt, in Granula aufgelöst oder ganz verschwunden. In der Karte sind solche fakultative „Puffs“ in den Chromosomen I, II und V eingezeichnet. Diese sind besonders häufig, wenn auch nicht immer so stark ausgeprägt, manchmal aber auch gar nicht entwickelt. Der Gehalt der Chromosomen an interkalarem Heterochromatin ist offenbar gering. Größere Mengen von Heterochromatin nehmen an dem Aufbau der proximalen Endzonen der Chromosomen I, III und V teil. Das stark färbbare, heterochromatische, proximale Ende des III-Chromosoms ist in den Präparaten oft abgebrochen. Paarungslücken kommen nur selten vor und erscheinen rein zufällig auf verschiedene Abschnitte der Chromosomen verteilt. Nur das kleine VI-Chromosom ist auffallend häufig teilweise oder sogar ganz ungepaart. In allen diesen Fällen ließ sich kein Unterschied in der Bandscheibenfolge der ungepaarten homologen Abschnitte erkennen.

Die in 842 Präparaten aus natürlichen Populationen bisher gefundenen 6 verschiedenen Dislokationen sind durchwegs einfache Inversionen (Abb. 1); davon liegen je eine im I-, II-, III- und IV-Chromosom und zwei im V-Chromosom. Ihre Grenzen sind in der Chromosomenkarte (Tafel I) eingezeichnet. Sie sind nach den ersten Fundorten benannt: I Ku, II Ku, III Ku, IV Sa, V Sa und V Bi. Die Standard-



a



b

Abb. 1a u. b. Heterozygote Inversionen. a III-Chromosom Ku/St; der lange Mittelabschnitt (••••• auf der Chromosomenkarte, Tafel I) würde links die beiden Chromosomenabschnitte zur Inversionsschlinge ergänzen; b IV-Chromosom, mittlerer von • bis • auf der Chromosomenkarte (Tafel I) reichender Abschnitt mit Sa/St-Inversion. Vergr. 1200 \times .

anordnung, nach der die Chromosomenkarte gezeichnet ist und auf die die Inversionen bezogen sind, entspricht der homozygoten Struktur, die als die häufigste homozygote Struktur am Standort „Kugelmiese“ vertreten ist. Die heterozygoten Zustände der genannten Inversionen werden im folgenden mit I Ku/St, V Sa/St usw. bezeichnet.

Zur Feststellung der Verteilung der Inversionen in der natürlichen Population wurden Pflanzenproben von verschiedenen Standorten eingebracht, die jeweils in einem Umkreis von höchstens 200 m Durchmesser gesammelt waren. In den Präparaten wurde nur das Vorkommen der heterozygoten Zustände der einzelnen Inversionen geprüft und als

Prozent der Gesamtzahl der geprüften Präparate dargestellt. Wie einige Stichproben zeigten, verhalten sich die Häufigkeiten der beiden homozygoten Zustände zum heterozygoten Zustand innerhalb der Fehlergrenzen nach der HARDY-WEINBERG-Regel.

Die Standorte, von denen die Proben zahlenmäßig genügend groß waren, sind die folgenden: 1. Mischwald am Wetterkreuz bei Hollenburg an der Donau (östliches Ende der Wachau, rechtes Donauufer), Höhe 350 m („Hollenburg“). 2. Mischwald an der Waldstraße nach Kugelmühle bei Perchtoldsdorf-Rodaun (Ostrand des Wiener Waldes), 400 m („Kugelmühle“). 3. Mischwald der Josefshöhe bei Perchtoldsdorf-Rodaun, in 1 km Entfernung von Standort 2, 450 m („Josefshöhe“). 4. Gebüsch im Mischwald zwischen Heiligenkreuz und Gaaden (östlicher Wiener Wald), 420 m („Gaaden“). 5. Mischwald hinter der Biologischen Station bei Lunz a. See (südliches Niederösterreich, Voralpen), 630 m („Lunz 1“). 6. Mischwald im Saugarten bei Schloß Seehof bei Lunz a. See, in etwa 1 km Entfernung von Standort 5, 700 m („Lunz 2“). 7. Unterholz am Waldrand bei Morzg, südlich von Salzburg (nördliche Kalkalpen), 450 m („Morzg“). 8. Waldrand bei Aigen, südöstlich von Salzburg, in etwa 3,5 km Entfernung von Standort 7, 480 m („Aigen“). 9. Gebüsch bei Acharting, Salzachgebiet nördlich von Salzburg, in etwa 14 km Entfernung von Standort 7, 410 m („Acharting“). 10. Gebüsch bei Werfen-Weng, Salzachgebiet etwa 40 km südöstlich von Salzburg, 540 m („Werfen“). 11. Junger Mischwald am Bisamberg, 1 km südöstlich von Dorf Bisamberg (nordöstlicher Vorberg des Wiener Waldes, linkes Donauufer), 250 m („Bisamberg“).

Die Inversionen I Ku, II Ku und III Ku sind in den untersuchten Gebieten stark verbreitet und sollen daher zuerst besprochen werden. Eine vergleichende Untersuchung am gleichen Standort an zwei aufeinanderfolgenden Jahren wurde nur für „Kugelmühle“ vorgenommen und hat ergeben:

Tabelle 1.

	I Ku/St	II Ku/St	III Ku/St	Zahl der Präparate
1949	22,2 \pm 4,4%	40,0 \pm 5,2%	5,5 \pm 2,5%	90
1950	23,1 \pm 5,8%	30,9 \pm 6,4%	3,8 \pm 2,7%	52

Zwischen den beiden Jahren ergab sich kein statistisch gesicherter Unterschied, so daß im folgenden die Summe beider Untersuchungen für den Standort verwendet werden soll. Die Stabilität der strukturellen Mannigfaltigkeit bestätigt die oben entwickelten Vorstellungen von den relativ stabilen statistischen Eigenschaften der *Liriomyza*-Populationen.

Der Vergleich nahe benachbarter Standorte ergab für die Standorte „Lunz 1“ und „Lunz 2“ (1 km Entfernung):

Tabelle 2.

	II Ku/St	III Ku/St	Zahl der Präparate
Lunz 1	48,1 \pm 6,8%	22,2 \pm 5,7%	54
Lunz 2	47,8 \pm 5,3%	21,1 \pm 4,3%	90

Es liegen keine statistisch gesicherten Differenzen vor, so daß die aus beiden Proben sich ergebende Summe im folgenden für den Standort „Lunz“ verwendet werden soll.

Für die 3 Standorte „Mozg“, „Aigen“ und „Acharting“, die in 3,5 bzw. 14 km Entfernung voneinander in der Salzburger Umgebung gelegen sind, ergibt sich:

Tabelle 3.

	II Ku/St	III Ku/St	Zahl der Präparate
Mozg	38,2 \pm 6,5%	21,8 \pm 5,6%	55
Aigen	42,3 \pm 6,8%	25,0 \pm 6,0%	52
Acharting	44,0 \pm 9,9%	20,0 \pm 8,0%	25

Auch hier ergeben sich keine gesicherten Differenzen und die Summe dieser drei Proben soll im folgenden als Standort „Salzburg“ angeführt werden.

Der Vergleich der beiden Standorte „Josefshöhe“ und „Kugelhöhe“, die in 1 km Entfernung voneinander im Wiener Wald liegen, ergibt jedoch:

Tabelle 4.

	I Ku/St	II Ku/St	III Ku/St	Zahl der Präparate
Josefshöhe . . .	36,0 \pm 6,8%	42,0 \pm 7,0%	28,0 \pm 6,3%	50
Kugelhöhe . . .	22,5 \pm 3,5%	36,6 \pm 4,0%	4,9 \pm 1,8%	142

Hier ergeben sich für die Inversionshäufigkeiten im I- und III-Chromosom statistisch gesicherte Unterschiede, so daß die beiden Standorte im folgenden Vergleich getrennt aufgeführt werden sollen. Die Bedeutung dieser und anderer Unterschiede zwischen nahe benachbarten Standorten soll später erörtert werden.

In der folgenden Tabelle sind die bisherigen Befunde aller Standorte übersichtlich zusammengestellt, sofern sie sich auf die häufigen Inversionen in den Chromosomen I, II und III beziehen.

Tabelle 5.

	I Ku/St	II Ku/St	III Ku/St	Zahl der Präparate
Hollenburg . .	48,4 \pm 9,0%	54,8 \pm 9,0%	61,3 \pm 8,8%	31
Gaaden	—	55,8 \pm 6,9%	—	52
Josefshöhe . .	36,0 \pm 6,8%	42,0 \pm 7,0%	28,0 \pm 6,3%	50
Werfen	—	53,5 \pm 7,6%	18,6 \pm 6,0%	43
Lunz	—	47,8 \pm 4,2%	21,5 \pm 3,5%	144
Salzburg . . .	—	40,9 \pm 4,3%	22,7 \pm 3,7%	132
Kugelmiese . .	22,5 \pm 3,5%	36,6 \pm 4,0%	4,9 \pm 1,8%	142
Bisamberg . .	43,3 \pm 6,0%	—	14,9 \pm 4,4%	67

Es bestehen zwischen den verschiedenen Standorten des untersuchten Gebietes, deren Lage aus der Kartenskizze (Abb. 2) zu ersehen ist, vielfach starke Unterschiede im Vorkommen oder in der Häufigkeit der 3 Inversionen. Daß die verschiedenen Inversionen bzw. ihre heterozygoten Zustände einen spezifischen Anpassungswert an bestimmte Standortsbedingungen haben, ist *nicht* anzunehmen. Standorte, die in allen klimatischen und sonstigen ökologischen Bedingungen miteinander eine weitgehende Ähnlichkeit zeigen, wie Hollenburg, Kugelmiese, Salzburg und Bisamberg zeigen wesentliche Unterschiede im Vorkommen und in der Häufigkeit der Inversionen. Standorte, die klimatisch und floristisch recht verschieden sind, wie Lunz und Salzburg, zeigen die gleichen Inversionen in gleicher Häufigkeit. Die Besonderheiten, die die Inversionen in Gaaden und Bisamberg zeigen, können keinesfalls mit ökologischen Besonderheiten dieser Standorte in Beziehung gebracht werden. Von einem extremen Standort am Nordhang des Hetzkogels bei Lunz (1000 m Seehöhe) konnten einige Larven untersucht werden, die — soweit es die geringe Zahl beweist — keine Besonderheiten gegenüber der Umgebung zeigten.

Das Vorkommen und die Häufigkeit der Inversionen sind jedoch keintswegs völlig regellos. Wie der Vergleich der obigen Tabelle mit der Kartenskizze (Abb. 2) zeigt, läßt sich für jede der 3 Inversionen eine Verteilung feststellen, die mit der geographischen Lage der Fundorte in eine regelhafte Beziehung gebracht werden kann. Die größte Häufigkeit zeigen die heterozygoten Zustände aller 3 Inversionen in Hollenburg, wo sie in etwa 50% aller Larven vorhanden sind. Die Überschreitung dieser Häufigkeit bei II Ku und III Ku ist nicht statistisch gesichert. Diese Überschreitung soll später noch nachgeprüft werden. Von Hollenburg aus ist gegen die verschiedenen Richtungen ein ungefähr der Entfernung proportionierter Abfall der Häufigkeit im Vorkommen der einzelnen Inversionen zu beobachten, der den Eindruck erweckt, als ob sich diese von einem Punkt aus radiär durch die Population ausgebreitet hätten. Besonders deutlich ist dies bei der Inversion III Ku

der Fall, deren Häufigkeit von Hollenburg gegen Osten (Bisamberg) und Südosten (Josefshöhe, Kugelwiese), aber auch gegen Süden (Lunz) und Südwesten (Salzburg, Werfen) sehr deutlich abnimmt. Weniger deutlich sind die Unterschiede für die Inversion II Ku, doch ist auch hier der Abfall der Häufigkeit gegen Süden, Südwesten und Südosten gegenüber Hollenburg statistisch gesichert. Die Inversion I Ku ist am häufigsten in Hollenburg und Bisamberg, weniger häufig südöstlich davon, während sie im Süden und Südwesten des Gebietes vollkommen fehlt. Man hat hier den Eindruck, daß diese Inversion vom Nordosten



Abb. 2. Lageplan der Fundorte im untersuchten Gebiet Österreichs.

her in das untersuchte Gebiet eingedrungen ist und die Standorte im Süden und Südwesten des Gebietes noch nicht erreicht hat. Die Inversion V Sa im V-Chromosom tritt in Lunz mit $9,7 \pm 2,5\%$ und in Salzburg mit $1,9 \pm 1,2\%$ Häufigkeit auf, fehlt dagegen an allen anderen Standorten. Sie wurde außerdem in einigen Präparaten eines Materials aus Admont (nördliche Steiermark) gefunden, sowie an einigen nur in kleinen Stichproben untersuchten Standorten südlich von Salzburg. Es könnte der Ursprung dieser Inversion weiter im Süden gelegen sein, so daß sie bei ihrer Ausbreitung die Grenzen des untersuchten Gebietes von Süden her gerade erst erreicht hat. Oder es handelt sich um eine Inversion jüngeren Ursprungs, die sich in der Population erst auszubreiten beginnt. Die Inversionen IV Sa und V Bi sind nur je einmal in Salzburg bzw. Bisamberg gesehen worden. Es sind wahrscheinlich neu aufgetretene Inversionen, die noch keine nennenswerte Verbreitung in der Population gefunden haben. Ob die hier entwickelten Anschauungen von der Verbreitung der Inversionen in der Population zutreffen, können erst weitere Untersuchungen, vor allem aus dem Norden, Süden und Westen Österreichs oder aus noch weiter entfernten Gebieten erweisen.

Gegen die Annahme einer gleichmäßigen, radiären Ausbreitung der Inversionen durch die Population scheinen nur die Befunde von Gaaden und Bisamberg zu sprechen, die besondere Verhältnisse zeigen. In Gaaden fehlt die Inversion III Ku ganz, obwohl dieser Standort nach seiner geographischen Lage (nur 12 km Entfernung von Josefshöhe und Kugelwiese) noch in das Verbreitungsgebiet dieser Inversion fallen müßte. In Gaaden fehlt aber auch die Inversion I Ku, die nach den Lagebeziehungen des Standortes zu Hollenburg, Josefshöhe und Kugelwiese vorhanden sein müßte. Am Standort Bisamberg fehlt hingegen die Inversion II Ku völlig, obwohl sie nach der Lage des Ortes (24 km von Josefshöhe und Kugelwiese, 47 km von Hollenburg) unbedingt zu erwarten wäre. Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesen beiden Standorten um Isolate handelt, in die mangels eines Zusammenhanges mit dem übrigen Verbreitungsgebiet von *Liriomyza* die Inversionen nicht eingedrungen sind oder in denen sekundär eine Verarmung an struktureller Mannigfaltigkeit auf statistischem Wege eingetreten ist. Bei Bisamberg könnte außerdem die Donau eine Isolation gegen die Ausbreitung der Inversion II Ku bewirkt haben. Die Auffassung dieser Standorte als Isolate stützt sich auf die Beobachtung, daß das Vorkommen von *Lilium martagon* im Wiener Wald tatsächlich, wohl infolge der Verfolgung durch den Menschen, in einzelne Inseln aufgelöst erscheint. So fehlt die Pflanze in der Umgebung des Standortes Gaaden in relativ weiten Gebieten und ihr Vorkommen auf dem Bisamberg ist eine deutlich isolierte Insel. Der oben (S. 528) erwähnte auffallende Häufigkeitsunterschied im Vorkommen der Inversionen I Ku und III Ku an den nur 1 km voneinander entfernten Standorten Josefshöhe und Kugelwiese im Wiener Wald kann wohl auch als Folge einer Isolierung dieser kleinen Vegetationsgruppen aufgefaßt werden. Die hier gegebene Deutung der abweichenden Befunde kann als Beweis für die strenge Bindung des Parasiten an die Wirtspflanze aufgefaßt werden, deren Populationsstruktur von ihm kopiert wird.

Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen der heterozygoten Zustände der verschiedenen Inversionen besteht nirgends. In den untersuchten Stichproben könnte auch keine Korrelation zwischen dem Auftreten der beiden homozygoten Zustände jeder Inversion zu denen der anderen gefunden werden.

Aus der Verbreitung der Inversionen lassen sich verschiedene Schlüsse auf ihre Entstehung ziehen, sowie auf die Faktoren, die die Verbreitung der Inversionen bewirken und damit auf die Bedeutung ihres Vorkommens in der natürlichen Population. Zunächst beweist das Häufigkeitsgefälle, das von einem Mittelpunkt auszugehen scheint, daß die verschiedenen Inversionen nur je einmal entstanden sind und sich dann vom Ort ihrer Entstehung ausgebreitet haben. Kein einziger der bisher

untersuchten Fälle läßt mit Sicherheit die Annahme einer mehrfachen Entstehung der gleichen Inversion zu. Dies ist auch nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, wie unwahrscheinlich es — bei Annahme einer rein zufälligen Verteilung der Bruchstellen — ist, daß eine und dieselbe Inversion mehrfach entsteht. Die Erhaltung und Ausbreitung einer einmal entstandenen Inversion wird zunächst von den statistischen Eigenschaften der Population abhängen. Bei *Liriomyza* handelt es sich um eine zahlenmäßig große und konstante, über ein großes Gebiet mehr oder weniger kontinuierlich verbreitete Population mit Panmixie. Der auf einen bestimmten Punkt bezogene Radius der Panmixie ist allerdings infolge der geringen Flugtätigkeit der Imagines wohl recht klein. Wenn in einer solchen Population eine Inversion entsteht, so liegt sie zunächst im heterozygoten Zustand, z. B. 1 Ku/St , bei einem Individuum vor, in einer Umgebung von lauter St/St -Tieren. Da bei Konstanz der Populationsgröße jedes Pärchen die durchschnittliche Aussicht hat, 2 fortpflanzungsfähige Nachkommen zu zeugen, so bestehen für die Erhaltung einer neu aufgetretenen Inversion die folgenden Aussichten. Aus der Kreuzung $\text{Ku/St} \times \text{St/St}$ gehen mit 50% Wahrscheinlichkeit die 2 Tiere Ku/St und St/St hervor, wobei sich an der Häufigkeit der Inversion nichts ändert. In 25% der Fälle sind diese beiden Individuen jedoch St/St und St/St , so daß die invertierte Sequenz, kaum daß sie entstanden ist, unwiederbringlich verloren geht. Mit 25% Wahrscheinlichkeit entstehen aber 2 Ku/St -Tiere, wobei sich die invertierte Sequenz verdoppelt hat. Da für jedes Ku/St -Tier auch weiterhin die gleichen Fortpflanzungsmöglichkeiten bestehen, kann im Anfang auch auf rein statistischem Wege, wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit, eine Vermehrung der invertierten Sequenz in der Population stattfinden. In zahlenmäßig kleinen, isolierten Teilen der Population kann es auf rein statistischem Wege nicht nur leicht zu einem Verlust, sondern auch zu einer übermäßigen Vermehrung der invertierten Sequenz, ja sogar zum Verlust der ursprünglichen Sequenz kommen, auf jeden Fall zu einer Verarmung an Mannigfaltigkeit. In einer zahlenmäßig großen, panmiktischen Population werden hingegen die statistischen Schwankungen eine immer geringere Rolle spielen, je größer die Zahl der in der Umgebung des Entstehungsortes bereits vorhandenen invertierten Chromosomen ist. Die Häufigkeit der invertierten Sequenz in der Population wird sich dann sehr bald nicht mehr ändern, sondern in einem Gleichgewicht nach der HARDY-WEINBERG-Formel verharren¹. Die in unserem Fall vorhandene Ausbreitung der Inversionen über so weite Gebiete, der hohe Grad ihrer Häufigkeit bis zu 50% Heterozygoten und das Häufigkeitsgefälle um einen Mittelpunkt weisen meines Er-

¹ Eine mathematische Behandlung dieser Frage bringt die gleichzeitig erscheinende Arbeit PRANZAGL, J.: Statistische Bemerkungen zu einer populationsgenetischen Frage. Statist. Vjschr. 4.

achters darauf hin, daß die Ausbreitung der Inversionen nicht nur durch statistische Vorgänge erfolgt sein kann, sondern daß ein Selektionsmoment wirksam sein muß. Das Verteilungsbild, das die Inversionen nach den bisherigen, allerdings noch recht lückenhaften Ergebnissen bieten, läßt sich am besten durch die Annahme erklären, daß dem heterozygoten Zustand der Inversionen ein Selektionsvorteil entspricht, daß es sich um eine Heterosiswirkung handelt, die die Verbreitung der Inversionen und ihren Einbau in die Population bewirkt. In diesem Fall wird durch die bevorzugte Vermehrung der Heterozygoten eine ständige Ausbreitung der Inversionen von ihrem Entstehungsort aus durch die Population bewirkt werden, die erst zum Stillstand kommt, wenn die Häufigkeit der Heterozygoten 50% erreicht hat. Eine Überschreitung dieser Häufigkeit würde auch dann noch nicht eintreten, wenn die Vermehrung ausschließlich von den Heterozygoten ausgeht. Es wird auch niemals zu einer Verdrängung der ursprünglichen Sequenz durch die invertierte Sequenz kommen, wie das der Fall wäre, wenn diese im homozygoten Zustand einen Selektionsvorteil bieten würde. Die beobachteten Verhältnisse bei *Liriomyza* wären als ein Abbild eines für die meisten Standorte noch nicht erreichten Gleichgewichtes aufzufassen, das bei dem langsamen Evolutionstempo unseres Objektes erst in langen Zeiträumen für die ganze Population erreicht werden könnte. Eine Überschreitung der Häufigkeit von 50% wäre bei den heterozygoten Larven nur dann zu erwarten, wenn die Homozygoten bereits im Larvenstadium gegenüber den Heterozygoten wesentlich benachteiligt wären. Sie ist auch noch nicht mit Sicherheit beobachtet worden.

Die Frage, worin die Heterosiswirkung der Inversionen besteht, läßt sich hypothetisch wohl am besten mit STURTEVANT und MATHER (1938) durch die Annahme beantworten, daß in 2 miteinander im Inversionsverhältnis stehenden Sequenzen, die eine Zeitlang in einer Population koexistieren, 2 verschiedene vitalitäts- oder fertilitätshemmende Kleinmutationen entstehen können. Man könnte sich auch vorstellen, daß eine in der ganzen Population von einem bestimmten Chromosomenabschnitt ausgehende hemmende Wirkung durch den Eintritt der Inversion in Form eines Positionseffektes aufgehoben und gleichzeitig eine andere hemmende Wirkung gesetzt werden könnte. Die Folge solcher Vorgänge wäre jedenfalls, daß beide homozygoten Zustände gegenüber dem strukturell heterozygoten Zustand benachteiligt würden. Durch die Inversion wäre eine Neukombination des Genbestandes in den Heterozygoten verhindert, so daß die Heterosiswirkung dauernd mit der strukturellen Heterozygotie verbunden bliebe. Eine experimentelle Prüfung dieser Annahme ist allerdings bei unserem Objekt kaum durchführbar. Daß gerade die beobachteten Inversionen durch ihre Heterosiswirkung ausgezeichnet und in die Population eingebaut sind und keine anderen, ist nach der eben entwickelten Auffassung

Zufall oder Wirkung eines Positionseffektes. Es entstehen bestimmt viel mehr verschiedene Inversionen spontan, wie schon die Beobachtung von 2 verschiedenen, nur je einmal gesehenen Inversionen in unserem zahlenmäßig gar nicht so großen Material zeigt. Doch werden nur wenige von ihnen durch das zufällige Eintreten von 2 verschiedenen Minusmutationen in den beiden verschiedenen Sequenzen oder durch reziprok wirkende Positionseffekte zum Einbau in die Population gelangen. Es ist natürlich auch die Vorstellung möglich, daß vielen spontan entstehenden Inversionen ein als Selektionsnachteil wirkender Positionseffekt anhaftet und ihr Einbau in die Population dadurch von Anfang an unmöglich gemacht ist.

Zusammenfassung.

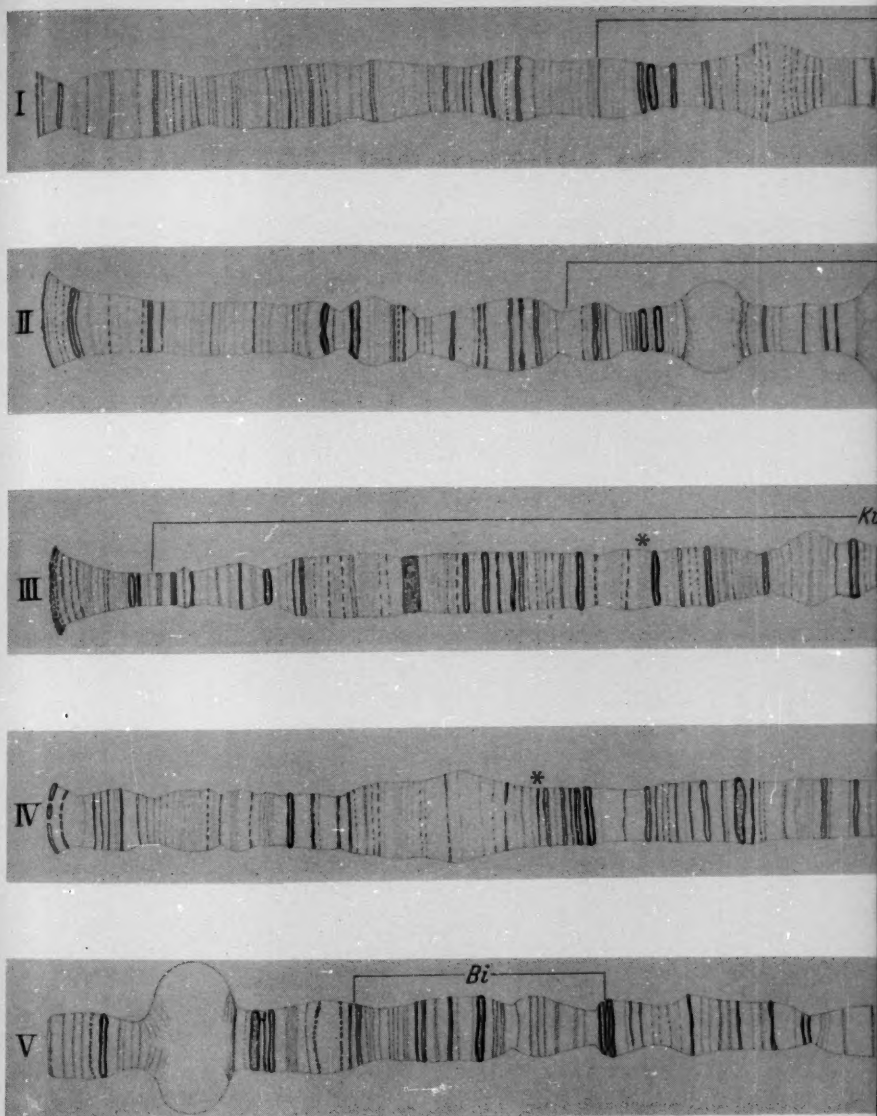
Die Larven der Agromyzide *Liriomyza urophorina* Mlk, die in den Blütenknospen von *Lilium martagon* parasitieren, zeigen in den Speicheldrüsen außerordentlich günstige Riesenchromosomen.

Bei der Untersuchung von Material von 11 verschiedenen Standorten in Österreich wurden 6 verschiedene Inversionen gefunden, davon 3 von großer Verbreitung und Häufigkeit. Die Häufigkeit und Verteilung dieser 3 Inversionen an den verschiedenen Standorten zeigen deutlich, daß sie keinen spezifischen Anpassungswert an bestimmte ökologische Bedingungen haben können. Sie zeigen, daß die Inversionen an bestimmten Orten einmalig entstanden sind und sich von dort ungefähr radiär durch die Population ausgebreitet haben. Ausnahmen von dieser Verteilung lassen sich als Isolationswirkungen erklären. Es wird die Annahme begründet, daß das beobachtete Verteilungsbild nicht auf rein statistischem Wege zustande gekommen ist, sondern am besten durch die Annahme einer Heterosiswirkung des strukturell heterozygoten Zustandes erklärt werden kann. Mögliche Ursachen dieser Heterosiswirkung werden erörtert.

Literatur.

- MAINX, F.: Chromosomentypen bei der Agromyzide *Liriomyza*. Symposium Pallanza, 1948. *Ricerca Scientifica* 19, Suppl., 77—78 (1949). — Die Bedeutung der Chromosomenaberrationen in natürlichen Populationen. *Portug. Acta Biol.*, Ser. A, Goldschmidt-Vol., 1950, 563—592. — Mlk, J.: Eine neue Agromyzide, deren Larven in den Blütenknospen von *Lilium martagon* leben. *Wien. entomol. Ztg* 13, 284—290 (1894). — MÜLLER, H. J.: Bearings of the *Drosophila* work on systematics. *The New Systematics*, ed J. HUXLEY. London: Oxford Univ. Press, 1940. — ROSS, H.: Die Pflanzengallen Mittel- und Nordeuropas. Jena: Gustav Fischer 1927. — STURTEVANT, A. H., and K. MATHER: The interrelations of inversions, heterosis and recombination. *Amer. Naturalist* 72, 447—452 (1938).

Prof. Dr. F. MAINX, Wien IX, Schwarzspanierstr. 17,
Institut für allgemeine Biologie.



F. MAINX, Die Verbreitung von Chromosomendislokationen.

Ku

Ku

Ku

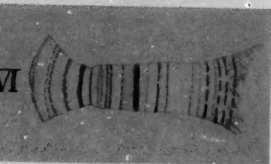
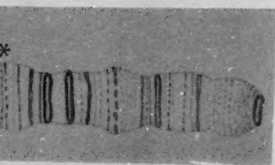
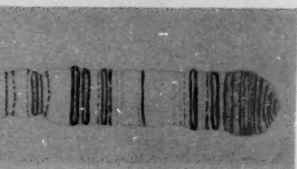
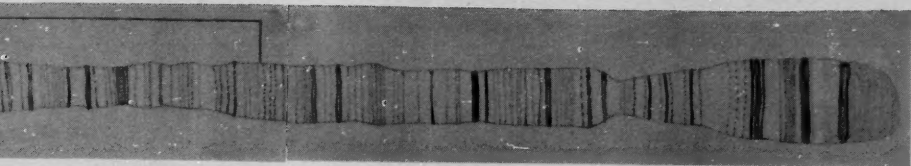
*

Sa

*

Sa

VI



Tafel I.

Chromosomenkarten
von *Liriomyza urophorina* MÜLL.,
Standardanordnung.

I bis VI:

Die 6 Speicheldrüsenchromosomen.

Eingetragen die Bereiche
der Inversionen I *Ku*, II *Ku*,
III *Ku*, IV *Sa*, V *Bi*, V *Sa*.

--- Vgl. Abb. 1 (S. 526).

Vergr. 2500 ×.

